

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. med. M. Frimmer

**Die Bedeutung von Vitamin A
für die Kathepsin-Aktivität der Rattenleber**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Robert Leurs

Tierarzt aus Mörmter bei Xanten

Gießen 1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. med. M. Frimmer

**Die Bedeutung von Vitamin A
für die Kathepsin-Aktivität der Rattenleber**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Robert Leurs

Tierarzt aus Mörmter bei Xanten

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. vet. H. TILLMANN

Berichterstatter: Priv.Do. Dr. med. vet. D. HEGNER

Tag der mündlichen Prüfung: 4.7.1969



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	4
2. <u>Problemstellung</u>	7
3. <u>Experimenteller Teil (Methoden)</u>	8
3.1 Chemisch-analytische Methoden	8
3.1.1 Bestimmung der Kathepsin-Aktivität	8
3.1.2 Bestimmung von saurer Phosphatase	10
3.1.3 Bestimmung der β -Glucuronidase	10
3.1.4 Proteinbestimmung	10
3.1.5 Bestimmung von DNS im Leberhomogenat	10
4. <u>Tierexperimentelle Versuche</u>	13
4.1 Intraperitoneale Behandlung von Ratten mit Vitamin A	13
4.2 Behandlung von Ratten mit Vitamin A per os	14
5. <u>Herstellung des Leberhomogenates und Zellfraktionierung</u>	15
5.1 Gewinnung des Leberhomogenates	15
5.2 Fraktionierung des Leberhomogenates	16
5.3 Isolierung einer lysosomenreichen Fraktion aus Rattenleber	17
6. <u>Ergebnisse</u>	20
6.1 Kathepsingehalt der Rattenleber nach Gabe von hohen Dosen Vitamin A	20
6.2 Versuche mit hypovitaminotischen Ratten	30
6.2.1 Kathepsin-Aktivität der Rattenleber nach verschiedener Dauer von Vitamin A-Mangel	30
6.2.2 Verteilung der Kathepsin-Aktivität auf subzelluläre Partikel der Leber von Vitamin A-Mangel- und Kontrolltieren	38
6.2.3 Resistenz der leichten, lysosomenreichen Mitochondrienfraktion von Vitamin A-Mangeltieren (8 000 - 15 000 x g-Sediment)	43
7. <u>Diskussion</u>	46
8. <u>Zusammenfassung</u>	52
9. <u>Literaturverzeichnis</u>	54

1. EINLEITUNG

Die biologische Funktion von Vitamin A sowie der biochemische Mechanismus beim Sehvorgang sind seit einigen Jahren weitgehend bekannt (WALD 1960). Dagegen sind derzeit über die systemische, physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieses Vitamins, insbesondere in Bezug auf anabole und katabole Reaktionen im Intermediärstoffwechsel bei Hyper- sowie Hypovitaminosen eine Reihe von Fragen offen (ROELS 1966). Die systemische Bedeutung der Wirkung von Vitamin A gewinnt besonders an Interesse, da Vitamin A-Präparate in zunehmendem Maße in der Veterinärmedizin als Futtermittelzusätze (TIEWS und ZENTZ 1967, MITCHELL 1967, SELKE et al. 1967) sowie auch bei Jungtierkrankheiten (HEIDRICH 1966) empfohlen werden. Andererseits mehren sich Befunde, daß Überdosierungen von Vitamin A bei Mensch (BENEDETTO 1967) und Tier (TIEWS et al. 1967, WOLKE et al. 1968) zu erheblichen Intoxikationen führen können. Neuerdings wurden Befunde erhoben, daß chronische Gaben von hohen Dosen Vitamin A die Cancerogenese bestimmter Stoffe potenzieren (LEVIJ et al. 1968) und z.B. bei Hühnern vermehrt zum Auftreten von Leukose führen (MARCH et al. 1967).

In den letzten Jahren erkannte man, daß Vitamin A die Funktion und Permeabilität von biologischen Membranen beeinflußt (Übersichten: DINGLE 1963, FRIMMER und GRIES 1968). Von KRAUSE et al. (1969) wird diese Wirkungsweise als eine mögliche zusätzliche Schlüsselfunktion des Vitamins gedeutet. Dabei sind sowohl zelluläre als auch intrazelluläre Membranen betroffen. Hohe Dosen von Vitamin A bewirken ebenso wie Vitamin A-Mangel eine Änderung der Permeabilität von biologischen Membranen. In vitro bewirkt Vitamin A eine Schädigung von Erythrozyten (DINGLE und LUCY 1962, GLAUERT et al. 1963), Zellkernen und Mitochondrien. LUCY et al. (1963), SEWARD et al. (1966) stellten fest, daß bei Rattenlebermitochondrien von hypo- oder hypervitaminotischen Tieren die gekoppelte oxydative Phosphorylierung stark vermindert ist.

LUCY und DINGLE (1962) konnten wahrscheinlich machen, daß niedrige physiologische Konzentrationen von Vitamin A für die normale Funktion biologischer Membranen erforderlich sind. Es wurde postuliert, daß Vitamin A am Aufbau von biologischen Membranen vermutlich als Cofaktor für die Verknüpfung von Lipid- und Proteinschicht erforderlich ist. In neueren Untersuchungen von KRAUSE et al. (1969) konnte der Nachweis erbracht werden, daß Vitamin A den Einbau von ^{32}Pi in Membranphospholipide beeinflusst.

Aus pathophysiologischer Sicht sind in den letzten Jahren die Lysosomen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Es ist dabei von Bedeutung, daß hohe Dosen von Vitamin A in vitro und in vivo die Lysosomenmembran labilisieren (DE DUVE et al. 1962, DINGLE et al. 1961). Dabei wurde von den Autoren eine vermehrte Freisetzung lysosomaler Hydrolasen in das Cytosol bzw. das Inkubationsmedium gemessen.

An embryonalen Knorpelimplantaten kommt es bei Anwesenheit von Vitamin A infolge der Aktivierung von partikelgebundenen proteolytischen Enzymen zum Verlust von Mucopolysacchariden und zur Abnahme der Metachromasie (LUCY et al. 1961). In vivo gehen sowohl Vitamin A-Mangel als auch Vitamin A-Hypervitaminosen bei Ratten mit einer zunehmenden Fragilität der Leberlysosomen einher. Isoliert man Leberlysosomen von Ratten, die hyper- oder auch hypovitaminotisch ernährt wurden, so kommt es zu einer signifikanten Zunahme der freien, nicht partikelgebundenen proteolytischen Aktivität während der Isolierung dieser Zellorganellen (DINGLE et al. 1966).

An der isoliert perfundierten Leber bewirken hohe Dosen Vitamin A vermehrte Freisetzung lysosomaler β -Glucuronidase in das Perfusionsmedium (FRIMMER et al. 1968). Lysosomenreiche Fraktionen, die aus Rattenlebern von Vitamin A-Mangel- sowie Vitamin A-hypervitaminotischen Tieren isoliert wurden, zeigten bei verschiedenen Stabilitätstests gegenüber Lysosomen von Kontrolltieren vermehrte Freisetzung von Hydrolasen (ROELS et al. 1965, DINGLE et al. 1966).

Die zuletzt genannten Autoren fanden bei diesen Untersuchungen, daß die Gesamtaktivität lysosomaler Hydrolasen (Kathepsin, saure Phosphatase und Arylsulfatase) bezogen auf das Frischgewicht der Leber sowohl bei Hypervitaminose als auch bei Vitamin A-Mangeltieren erhöht war. Es wurde vermutet, daß als Folge der erhöhten Freisetzung von partikelgebundenen Hydrolasen bei Vitamin A-Mangel sowie hypervitaminotischen Tieren eine kompensatorische Synthese von lysosomalen Enzymen in der Leber stattfindet. Einen Hinweis, daß Vitamin A Enzyminduktion bewirken kann, wurde kürzlich von RILEY et al. (1968) gegeben. Die Autoren haben gefunden, daß Langzeitbehandlung der Haut von Mäusen mit Vitamin A-Acetat eine RNS-abhängige Synthese von alkalischer Phosphatase in Epithelzellen stimuliert. Da endogene partikelgebundene Proteasen für die Pathogenese der Entzündung, Autolyse und Nekrose, vermutlich auch für katabole Reaktionen im Stoffwechsel der Zelle von maßgeblicher Bedeutung sind (DE DUVE et al. 1966, ARONSON et al. 1968, COFFEY et al. 1968), erschien es daher von Interesse, der Frage der Enzyminduktion nachzugehen. Eine Induktion lysosomaler Proteasen bzw. eine kompensatorisch vermehrte Neusynthese nach chronischer Gabe von Vitamin A bzw. bei Vitamin A-Mangeltieren könnte bedeuten, daß entzündliche Reaktionen, insbesondere die Zellautolyse und Nekrose, in verstärktem Maße ablaufen. Einen Hinweis auf diese Hypothese geben Untersuchungen von HELMEYER et al. (1968). Die Autoren fanden, daß bei Kaninchen nach Gabe von hohen Dosen Vitamin A die Haut auf lokale Injektionen von Endotoxinen vermindert reagiert. Diese Abschwächung der entzündlichen Reaktion wurde dahingehend gedeutet, daß Lysosomen bei Vitamin A-Überdosierung zunächst akut für Hydrolasen permeabel werden, und daß infolge dieses Enzymverlustes die Hemmung der Entzündung erklärbar sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob im Gesamthomogenat der Leber von Ratten, die per os bzw. intraperitoneal mit Vitamin A behandelt wurden, unter Anwendung

verschiedener Bezugssysteme, eine Vermehrung der proteolytischen Aktivität nachweisbar ist. Außerdem sollte geprüft werden, ob Vitamin A-Mangeltiere eine Änderung der Kathepsinaktivität der Leber zeigen.

2. PROBLEMSTELLUNG

Aufgabe dieser Arbeit war, zu prüfen, ob:

1. Vitamin A nach parenteraler Gabe eine Steigerung der Kathepsinaktivität in der Rattenleber bewirkt. Zum Nachweis der Steigerung von Kathepsin sollten dabei verschiedene Bezugssysteme gewählt werden.
2. eine einmalige Dosis von Vitamin A bzw. eine perorale Dauerbehandlung zu einer vermehrten Synthese von Kathepsin in der Leber führt.
3. Vitamin A-Mangel zu einer Änderung der spezifischen Aktivität von Kathepsin in der Leber führt. Dabei sollte ermittelt werden, in welchem Maße die verschiedene Dauer der Vitamin A-Mangelperioden einen Einfluß auf die Aktivität dieser endogenen Protease hat.
4. bei Vitamin A-Mangeltieren die subzelluläre Verteilung von Kathepsin gegenüber Kontrollen unterschiedlich ist. Gleichzeitig sollte in einer subzellulären Fraktion die Stabilität der Lysosomenmembran bezüglich der Permeabilität von Kathepsin bei Vitamin A-Mangel- und Kontrolltieren untersucht werden.

3. Experimenteller Teil (Methoden)

3.1 Chemisch-analytische Methoden

3.1.1 Bestimmung der Kathepsin-Aktivität

Kathepsin wurde nach der Methode von ANSON (1936) bestimmt. Die Methode wurde an das Mikrolitersystem der Fa. Eppendorf adaptiert. Als Substrat diente eine 2%ige Hämoglobinlösung * in Acetatpuffer (0,05m, pH 4,0). 0,7 ml Ansatz enthielten: 0,5 ml Puffer-Substratlösung und 0,1, 0,15 bzw. 0,2 ml Enzym-lösung. Der Ansatz wurde bei Enzymlösungen unter 0,2 ml je- weils mit dest. Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (0,7 ml). Die Inkubationszeit betrug 10 Min. bei 37° C. Nach der ange- gebenen Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 0,2 ml 12,5%- iger Trichloressigsäure (TCE) gestoppt. In einem aliquoten Teil des auf der Mikrozentrifuge (Eppendorf) klar zentrifu- gierten Überstandes wurde das säurelösliche Tyrosin nach LOWRY et al. (1951) bestimmt. Die Enzymaktivität wurde aus- gedrückt in μg Tyrosin freigesetzt pro mg Protein pro 10 Min. bei 37° C. Außerdem wurde das freisetzbare Tyrosin auf Gramm Frischgewicht der Leber sowie in einem Teil der Versuche auf mg DNS bezogen.

Die Enzymlösung wurde, bevor sie zur Proteinbestimmung ver- wendet wurde, wie folgt hergestellt: 2 ml Leberhomogenat (Lösungsmittel 0,25m Saccharoselösung pH 7,0, mit 0,1n NaOH eingestellt) wurden mit 2 ml dest. Wasser, das 0,2% Triton X 100** enthielt, verdünnt und bei 37° C 10 Min. im Wasser- bad inkubiert. Auf diese Weise wurde das latente, partikel- gebundene Kathepsin solubilisiert. Danach wurde das Inkubat noch einmal 1:5 mit dest. Wasser verdünnt.

* Hämoglobin vom Rind, Protease-Substrat n. ANSON, rein. Serva, Heidelberg, Best.Nr. 24510.

** Serva, Heidelberg, Best.Nr. 37240.

Für die vorliegenden Untersuchungen war zunächst die Linearität der Enzymreaktion in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge zu prüfen. Dazu wurden jeweils 0,1, 0,15 und 0,2 ml Homogenat für die Kathepsinbestimmung eingesetzt. Die Abb. 1 zeigt, daß die Aktivität von Kathepsin der eingesetzten Proteinmenge in einem Bereich von 0,1 - 1,3 mg/ml Enzymlösung direkt proportional ist.

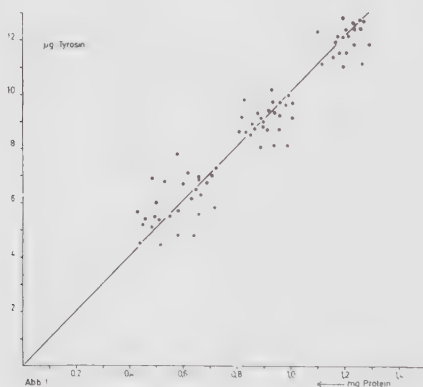


Abb. 1: Prüfung der Linearität zwischen eingesetztem Enzymprotein (Leberhomogenat) und Kathepsin-Aktivität

Abszisse: mg Protein pro ml Enzympräparation (Leberhomogenat)

Ordinate: µg säurelösliches Tyrosin freigesetzt in 10 Min.
bei 37° C, pH 4,0.

Für die Versuche der Kathepsinbestimmungen wurden nur Enzymproben eingesetzt, die maximal 0,725 mg Protein pro ml enthielten. Zur Bestimmung des freien Tyrosins in der Enzympräparation wurden Kontrollproben angesetzt. Die Kontrollansätze wurden zur Zeit t_0 mit 12,5%iger TCE versetzt, anschließend wurde Enzymlösung zugegeben. Im klar zentrifugierten Überstand wurde das freie Tyrosin bestimmt. Bei allen Messungen

wurde jeweils das freie Tyrosin (t_0) von dem Tyrosingehalt der Proben, die 10 Min. bei 37° C inkubiert waren, subtrahiert. Jeder gefundene Meßwert setzt sich jeweils aus sechs bzw. acht Parallelbestimmungen zusammen.

3.1.2 Die saure Phosphatase

wurde mit Na- β -glycerophosphat als Substrat nach GIANETTO und DE DUVE (1955) bestimmt. Im enteweißten, klar zentrifugierten Überstand wurde das anorganische Phosphat nach der Methode von CHEN, modifiziert nach BRUCE et al. (1960) bestimmt.

3.1.3 β -Glucuronidase

wurde nach FISHMAN et al. (1948) und FOLLETTE et al. (1952) mit Phenolphthalein-mono- β -glucuronid als Substrat bestimmt.

3.1.4 Proteinbestimmung

Protein wurde zu Beginn der Versuche nach der modifizierten Biuret-Methode (WEICHSELBAUM 1946, BEISENHERZ et al. 1953) bestimmt. Es stellte sich jedoch heraus, daß trotz Zentrifugieren die durch Lipide bedingte Trübung nicht vollständig eliminiert werden konnte, so daß die Reproduzierbarkeit der Meßwerte nicht gewährleistet war. Die Methode wurde daraufhin modifiziert und nach Angaben von BODE et al. (1968) durchgeführt.

3.1.5 Bestimmung von DNS im Leberhomogenat

DNS wurde mit Hilfe der Diphenylamin-Reaktion nach BURTON (1956) bestimmt. Dazu wurde zur Entfernung niedermolekularer Störsubstanzen, z.B. freie Nucleotide, Kohlehydrate, anorganische und organische Phosphatverbindungen, Nucleinsäure wie folgt extrahiert. Das Verfahren wurde in Anlehnung an BURTON (1955) durchgeführt. 1 ml Homogenat wurde mit 3 ml dest. Wasser und 4 ml 0,5m Perchlorsäure in 20 ml-Stahlzentrifugenbecher (Sorvall) gegeben. Die Proben wurden eine Minute mit Hilfe eines Magnetrührers bei 0 bis 4° C im Kältelabor ge-

schüttelt. Anschließend wurde 10 Min. bei 20 000 x g auf einer Sorvall-Kühlzentrifuge RC 2-B bei 0 bis 4° C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 10 ml 0,25m HClO₄ aufgefüllt, resuspendiert und erneut 10 Min. bei 20 000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 4 ml 0,5m HClO₄ resuspendiert.

Anschließend wurden die Proben in einem Wasserbad (90° C) unter ständigem Rütteln (mechanische Rüttelmaschine) hydrolysiert. Nach einer Hydrolysedauer von 15 bis 20 Min. bei 90° C wurden die Proben erneut 10 Min. bei 20 000 x g sedimentiert. Der so gewonnene Überstand wurde in 10 ml-Kölbchen mit 0,5m HClO₄ auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und diente zur Bestimmung der DNS.

Die Proben für die DNS-Bestimmung enthielten 1 ml Hydrolysat und 3 ml Diphenylreagenz nach DISCHE (1929). (In 100 ml Eisessig 99-100% wurden 1,5 g Diphenylamin p.a.* gelöst, dazu 1,5 ml konz. H₂SO₄. Das Reagenz wurde im Dunkeln aufbewahrt.) Die Proben wurden 10 bis 15 Min. bei 90° C inkubiert, anschließend unter Leitungswasser abgekühlt, im Dunkeln 1/2 bis 1 Stunde aufbewahrt und bei 595 nm mit dem Zeiss-Photometer (QM 2) in 10mm-Küvetten gemessen. Die entsprechende Kontrollprobe wurde in der gleichen Weise behandelt. Sie enthielt anstelle des Hydrolysates 1 ml 0,5m HClO₄.

Zur Herstellung der Eichkurve für DNS wurde wie folgt verfahren: 50 mg DNS (Fa. Serva, Heidelberg, Nr. 18580) wurden in 40 ml 0,5m HClO₄ gelöst, anschließend 30 Min. bei 90° C im Wasserbad hydrolysiert. Nach Abkühlen unter Leitungswasser auf 20° C wurde in einem Kolben auf 50 ml mit 0,5m HClO₄ aufgefüllt (DNS-Standard). Für die Eichkurve wurden folgende DNS-Konzentrationen verwendet: 1 ml enthielt jeweils 1000,0 µg, 800,0 µg, 600,0 µg, 400,0 µg und 200,0 µg DNS.

* Fa. E. Merck, Darmstadt, Best.Nr. 3086

Schema:

	DNS-Standard	0,5M HClO ₄	Diphenyl-Reagenz
1000,0 µg	1,0 ml	-	3 ml
800,0 µg	0,8 "	0,2 ml	3 "
600,0 µg	0,6 "	0,4 "	3 "
400,0 µg	0,4 "	0,6 "	3 "
200,0 µg	0,2 "	0,8 "	3 "
Leerwert	-	1,0 "	3 "
Hauptwert	1,0 " Hydro- lysat	-	3 "

Die auf diese Weise erhaltene Eichkurve ist in Abb. 2 dargestellt (S. 12)

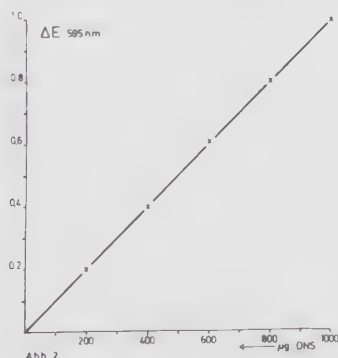


Abb. 2: Eichkurve für DNS-Bestimmung nach DISCHE

Abszisse: µg DNS (Serva, Heidelberg, Best.Nr. 18580)

Ordinate: E_{595 nm}

4. Tierexperimentelle Versuche

Alle Tiere (behandelte und Kontrollen = Wistar-Ratten AF/Han.) erhielten während der vier folgenden Versuchsserien "Altromin Allein-Diät für Ratte und Maus" ad. lib.

4.1 Intraperitoneale Behandlung von Ratten mit Vitamin A

Versuchsgruppe I

Als Versuchstiere dienten 14 weibliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 150 bis 190 g. 7 Tiere dienten als Kontrollen.

Kontroll- und Versuchstiere wurden wie folgt behandelt. Die Versuchsgruppe erhielt ein Vitamin A-Präparat intraperitoneal, das pro ml Lösung 80 000 i.E. Vitamin A-Palmitinsäure-ester und 20 000 i.E. Vitamin A-Alkohol enthielt (Chargen-Nr. Ro-1-5852/314F). Die Kontrollgruppe erhielt jeweils die gleiche Menge einer Placebolösung mit derselben Chargen-Nr. Das Placebo enthielt einen nicht ionogenen Emulgator auf Polyäthylenglycolbasis und Glycerin sowie als Konservierungsmittel Phenylmercurinitrat 1:50 000.

Jedes Tier der Versuchsgruppe erhielt: 7 Tage lang 10 000 i.E./die, dann 13 Tage 5 000 i.E./die, 7 Tage wieder 10 000 i.E./die und schließlich 7 Tage 20 000 i.E./die. Die Kontrollgruppe erhielt die entsprechende Volumenmenge Placebo.

Jeweils 24 Std. nach der 2., 5., 11., 17., 24., 31. und 34. Injektion wurde ein Paar getötet, d.h. ein Kontroll- und ein Vitamin A-behandeltes Tier. Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet, entblutet und die Leber entnommen. Nachdem das Frischgewicht der Leber ermittelt war, wurde ein Gewebsnomogenat in der unten beschriebenen Weise hergestellt.

Versuchsgruppe II

Als Versuchstiere dienten hier 14 weibliche Wistar-Ratten mit

einem durchschnittlichen Gewicht von 140 bis 170 g. 7 Tiere dienten als Kontrollen. 7 Tiere wurden mit Vitamin A behandelt. Das intraperitoneal applizierte Vitamin A-Präparat enthielt pro ml wäßriger Lösung 100 000 i.E. Vitamin A-Palmitat sowie 25 000 i.E. Vitamin A-Alkohol (Chargen-Nr. Ro-1-5852/314F Hoffmann-La Roche, Basel). Die Kontrollgruppe erhielt den Lösungsvermittler der wäßrigen Vitamin A-Lösung als Placebo.

Beide Gruppen wurden insgesamt über 23 Tage behandelt. 7 Tiere erhielten über 23 Tage 10 000 i.E. Vitamin A pro Tag und Tier. Jeweils 24 Stunden nach der 3., 5., 9., 11., 17., 20. und 23. Injektion wurden ein Placebo- und ein Vitamin A-behandeltes Tier getötet.

4.2 Behandlung von Ratten mit Vitamin A p e r o s

Versuchsgruppe III

Hier dienten 12 weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 140 bis 180 g als Versuchstiere. 6 Tiere dienten davon als Kontrollen, 6 wurden behandelt. Die behandelten Tiere erhielten zu Beginn des Versuches Vitamin A-Alkohol krist. (Chargen-Nr. B 607117 Hoffmann-La Roche, Basel) in folgendem Medium peroral appliziert: 120 mg Vitamin A-Alkohol wurden in 1 ml Äthanol abs. gelöst, anschließend mit 9 ml Ol. oliv. (DAB 6) versetzt. 1 ml dieser Lösung enthielt ca. 40 000 i.E. Vitamin A-Alkohol. Die 6 Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel (1 ml Äthanol und 9 ml Ol.oliv.) als Placebo. Nach dieser einmaligen Applikation wurden jeweils zwei Tiere, d.h. ein Placebo- und ein behandeltes Tier am 1., 3., 5., 7., 10. und 13. Tag nach der Vitamin A-Gabe getötet. Die Lebern wurden entnommen, gewogen und im Gewebshomogenat die Kathepsin-Aktivität bestimmt.

Versuchsgruppe IV

Als Versuchstiere dienten hier 12 weibliche Wistar-Ratten mit

einem Gewicht von 160 bis 190 g. 6 Tiere waren Kontrollen, 6 Vitamin A-Alkohol krist. (Chargen-Nr. Ro-1-4955) behandelte. Das krist. Präparat wurde in 1,0 ml Äthanol abs. gelöst und mit 9,0 ml Ol. oliv. (DAB 6) weiter verdünnt. 1 ml dieser Lösung enthielt ca. 20 000 i.E. Vitamin A.

Die 6 behandelten Tiere erhielten täglich 20 000 i.E. per os mit der Schlundsonde appliziert. Die 6 Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel (1 ml Äthanol und 9 ml Ol. oliv.) in der entsprechenden Menge täglich als Placebo.

24 Std. nach der 2., 5., 8., 14., 19. und 26. Behandlung wurde jeweils ein behandeltes und ein Tier der Kontrollgruppe getötet, die Lebern entnommen und im Gewebshomogenat Kathepsin bestimmt.

Von allen vier Versuchsgruppen (I, II, III, IV) wurden zusätzlich jeweils fünf Tiere, die weder mit Placebo noch mit Vitamin A behandelt waren, zu Beginn des Versuchsverlaufes getötet, die Lebern entnommen und im Gewebshomogenat Kathepsin bestimmt. Von diesen Werten wurde σ nach der Beziehung $\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$ errechnet. Die biologische Streuung ist jeweils in den Diagrammen eingetragen.

5. Herstellung des Leberhomogenates und Zellfraktionierung

5.1 Gewinnung des Leberhomogenates

Unmittelbar nach der Entnahme der Lebern wurden diese in eiskühlte 0,25m Saccharoselösung, die mit 0,1n NaOH auf pH 7,0 eingestellt war, gegeben. Alle weiteren Arbeitsgänge erfolgten bei 0-4° C. Nachdem das Frischgewicht der Lebern ermittelt war, wurden sie mit einer Schere fein zerkleinert und mit dem POTTER-Homogenisator homogenisiert. Dabei wurden konstant zwei Hübe durchgeführt. Das gewonnene Leberhomogenat wurde jeweils auf 30 ml mit eiskalter 0,25m Saccharoselösung

aufgefüllt. Nach Aufschluß des Leberhomogenates mit Triton X 100 (siehe Seite 8) wurde Kathepsin bestimmt.

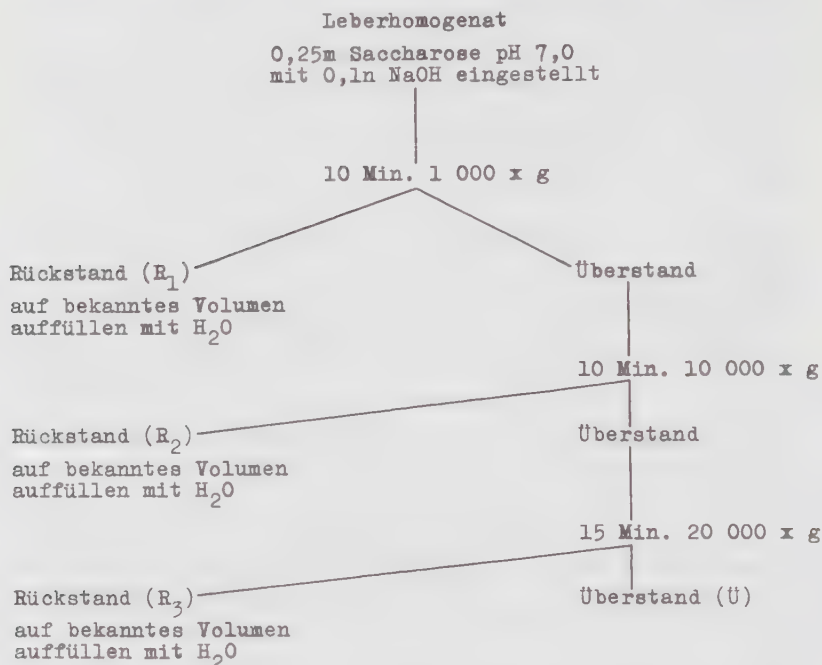
5.2 Fraktionierung des Leberhomogenates

zur Ermittlung der relativen spezifischen Aktivität in den einzelnen Fraktionen geschah nach folgendem Schema Nr. 1 (Seite 17). Die Fraktionierung erfolgte in Anlehnung an die Methode von DE DUVE (1962).

6 Mangeltiere und 6 Kontrolltiere, deren Daten in der Tabelle 1, Versuchsgruppe C und Tabelle 2, Versuchsgruppe D enthalten sind, wurden für das Verteilungsspektrum der Kathepsin-Aktivität verwendet. Das Leberhomogenat wurde wie oben beschrieben hergestellt. Anschließend wurde 10 Min. bei 1000 x g auf einer Sorvall-Kühlzentrifuge RC2-B zentrifugiert. Der Rückstand (R_1 Zellkernfraktion und unzerstörte Zellen) wurde auf 30 ml mit dest. Wasser aufgefüllt und resuspendiert. Der Überstand wurde 10 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert und der dabei erhaltene Rückstand (R_2 sog. schwere Mitochondrienfraktion: er enthielt einen Teil der Lysosomen sowie Mitochondrien) gleichfalls mit dest. Wasser auf 30 ml aufgefüllt und resuspendiert. Der Überstand wurde 15 Min. bei 20 000 x g zentrifugiert; der erhaltene Rückstand (R_3) enthielt die leichte Mitochondrienfraktion zusammen mit dem größten Teil der Lysosomen. R_3 wurde ebenfalls mit dest. Wasser auf 30 ml aufgefüllt und resuspendiert. Der verbliebene Überstand enthielt die Mikro-somenfraktion sowie die sog. freie, nicht partikelgebundene Aktivität lysosomaler Enzyme.

Auch das Volumen des zuletzt verbliebenen Überstandes ($\bar{U}$) wurde gemessen. In allen erhaltenen Fraktionen wurde nach Aufschluß mit Triton X 100 die spezifische Aktivität sowie die relative spezifische Kathepsin-Aktivität, bezogen auf Protein- und Enzymgehalt des Gesamthomogenates, bestimmt. Die relative spezifische Aktivität wurde nach den Angaben von DE DUVE (1959) wie folgt ausgedrückt: prozentualer Anteil des Kathepsin der jeweiligen Fraktion am Gesamthomogenat dividiert

Schema Nr. 1: Fraktionierung des Leberhomogenates



durch Prozent Protein der Fraktion vom Gesamthomogenat. Der erhaltene Quotient $\frac{\% \text{ Ges. Aktivität Kathepsin}}{\% \text{ Ges. Protein}}$ wurde gegen den Proteingehalt der Fraktion in Prozent aufgetragen.

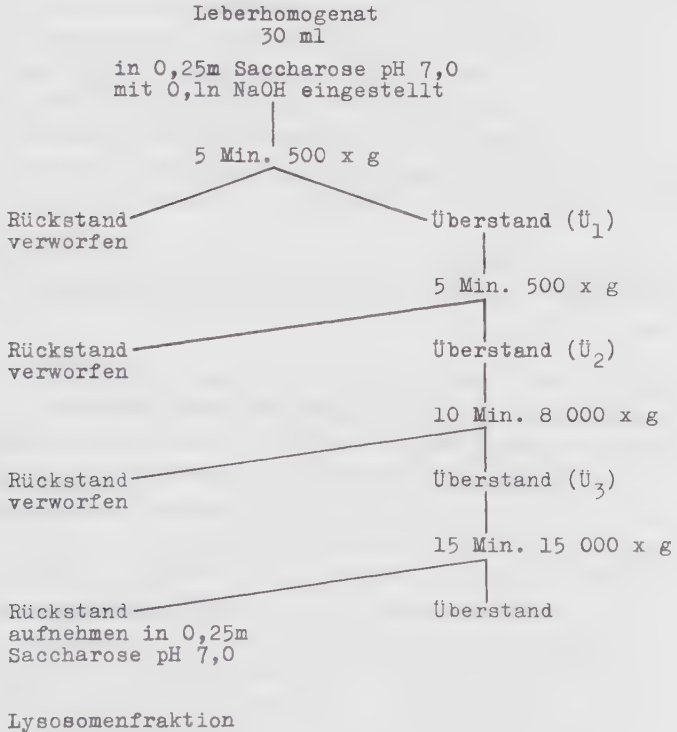
Von jeder der ermittelten Fraktionen (R_1 , R_2 , R_3 und $\bar{U}$) wurde eine Proteinbestimmung nach der BIURET-Methode, modifiziert nach BODE et al. (1968), durchgeführt.

5.3 Isolierung einer lysosomenreichen Fraktion aus Rattenleber

Die Isolierung einer lysosomenreichen Fraktion erfolgte ebenfalls in Anlehnung an die Methode von DE DUVE et al. (1962).

Eine schematische Übersicht über das Präparationsverfahren gibt das nachfolgende Schema Nr. 2.

Schema Nr. 2: Isolierung einer lysosomenreichen Fraktion aus Rattenleber



Die unmittelbar nach dem Töten entnommene Leber wurde gewogen und in eisgekühlter 0,25m Saccharoselösung, die mit 0,1n NaOH auf pH 7,0 eingestellt war, aufbewahrt. Anschließend wurde ein Gewebshomogenat nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt. Eine Leber von einem mittleren Gewicht von ca. 7 bis 10 g wurde in 30 ml eiskalter Saccharoselösung

in einem Homogenisator nach POTTER homogenisiert. Das Gesamthomogenat wurde 5 Min. bei 500 x g auf einer Sorvall-Kühlzentrifuge (RC2-B) zentrifugiert. Der Rückstand, vorwiegend aus Zellkernen bestehend, wurde verworfen, der Überstand ($\ddot{U}_1$) erneut 5 Min. bei 500 x g zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde verworfen; er enthielt noch Reste von intakten Zellen und Kerntrümmer. Der erhaltene Überstand ($\ddot{U}_2$) wurde 10 Min. bei 8 000 x g sedimentiert, um die schwere Mitochondrienfraktion abzutrennen. Das Sediment wurde abermals verworfen. Der erhaltene Überstand ($\ddot{U}_3$) wurde 15 Min. bei 15 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde als lysosomenreiche Fraktion zur Bestimmung der Lysosomenresistenz bei pH 5,0 verwendet.

5 Mangeltiere und 5 Kontrolltiere, deren Daten in der Tabelle 9 (S. 44) enthalten sind, wurden für den Lysosomenresistenztest verwendet.

Die Lysosomenfraktion wurde mit eiskühlter 0,25m Saccharoselösung auf 6,0 ml aufgefüllt, resuspendiert und für den Resistenztest verwendet. Die Resistenz der Lysosomenfraktion bei pH 5,0 wurde in Anlehnung an die Methode von DE DUVE et al. (1962) geprüft. Danach geben intakte Lysosomen bei pH 5,0 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ihre partikelgebundenen Hydrolasen frei. Der Ansatz für diese Versuche setzte sich wie folgt zusammen: 0,5 ml Lysosomenfraktion, 1,0 ml 0,25m Saccharose in 0,25m Acetatpuffer pH 5,0 und 1,0 ml 0,25m Saccharose pH 7,0. Die Endkonzentration an Acetatpuffer betrug demnach 0,1m. Die Ansätze wurden bei 37° C inkubiert und zur Zeit t_0 , t_{20} , t_{40} und t_{60} Min. auf der Sorvall (RC2-B) 20 Min. bei 20 000 x g sedimentiert. Im granulafreien Überstand wurde die freigesetzte Kathepsin-Aktivität bestimmt.

Zur Ermittlung der gesamten freisetzbaren Aktivität wurde wie folgt verfahren: 2,5 ml Ansatz enthielten 0,5 ml Lysosomenfraktion, 1,25 ml Triton X 100 0,2% und 0,75 ml Saccha-

roselösung pH 7,0. Die Endkonzentration an Triton X 100 betrug 0,1%. Der Ansatz wurde 10 Min. bei 37° C inkubiert und in der gleichen Weise behandelt (Zentrifugation 20 Min. bei 20 000 x g). Die im Überstand von diesen Proben gemessene Kathepsin-Aktivität wurde gleich 100% gesetzt.

In einem dritten Ansatz wurde die sog. freie Aktivität, d.h. nicht partikelgebundene bestimmt. Dazu wurden 0,5 ml Lysosomenfraktion in 2,0 ml 0,25m Saccharoselösung pH 7,0 pipettiert, im Eisbad aufbewahrt und 20 Min. bei 20 000 x g sedimentiert. Die im Überstand gemessene Aktivität stellt die freie, sog. nicht partikelgebundene Lysosomenaktivität dar. Sie wurde von den übrigen Proben als Leerwert abgezogen.

Die im Verlauf von 60 Min. bei pH 5,0 freisetzbare Kathepsin-Aktivität wurde in % der gesamten freisetzbaren Aktivität ausgedrückt.

Die Versuchsprotokolle über den Status sowie die Dauer der Mangelperiode von hypovitaminotischen Ratten wurden mir freundlicherweise von der Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt. Sie wurden den jeweiligen Versuchsergebnissen zugeordnet.

6. ERGEBNISSE

6.1 Kathepsingehalt der Rattenleber nach Gabe von hohen Dosen Vitamin A

Die Ergebnisse der Versuchsgruppen I und II (S. 13 + 14) sind in den Abb. Nr. 3, 4 und 5 zusammengefaßt.

In der Abb. 3 wurde die spezifische Aktivität von Kathepsin, bezogen auf mg Protein, gegen die Versuchsdauer sowie die Gabe von Vitamin A in internationalen Einheiten (i.E.) aufgetragen. Die mittlere Streuung der Kathepsin-Aktivität im Gesamthomogenat von unbehandelten Kontrolltieren (n = 5) ist am

Beginn der Kurve eingetragen. Aus dem Diagramm geht hervor, daß die Kathepsin-Aktivität im Leberhomogenat nach zwölf-tägiger intraperitonealer Behandlung bei einer Vitamin A-Gabe von insgesamt 120 000 i.E. in geringem Maße unter den Wert der biologischen Streuung abfällt.

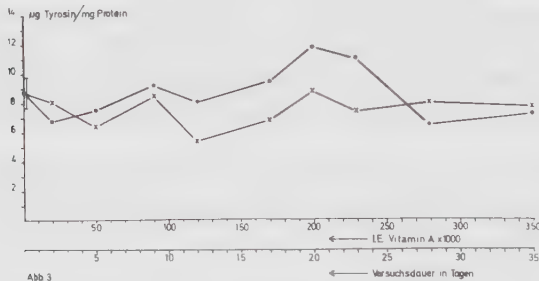


Abb. 3: Spezifische Aktivität von Kathepsin bezogen auf mg Protein in Leberhomogenaten nach Behandlung mit Vitamin A (i.p.) und Placebo

Ordinate: μg Tyrosin freigesetzt pro mg Protein pro 10 Min. bei 37°C

Abszisse: a) Dosen von Vitamin A in i.E. x 1000 pro Tier
b) Versuchsdauer in Tagen

Die biologische Streuung der Kathepsin-Aktivität zu Beginn des Versuches wurde von 5 Tieren ermittelt, die weder Placebo noch Vitamin A erhalten hatten.

•—• Placebo-behandelte Tiere, x—x Vitamin A-behandelte Tiere

Setzt man den Mittelwert der Enzymaktivität von unbehandelten Kontrolltieren gleich 100%, so beträgt der Abfall 38,7%,

wobei allerdings die mittlere Streuung des Mittelwertes bereits $\pm 12,0\%$ beträgt.

Nach 20 Versuchstagen kommt es bei der mit Placebo behandelten Gruppe gegenüber unbehandelten Kontrollen zu einem geringen Anstieg der Enzymaktivität um $34,0\%$. Im Verlaufe des Versuches normalisiert sich jedoch die spezifische Aktivität des Kathepsin wieder und liegt bei Vitamin A-hypervitaminotischen Tieren bis zu Ende des Versuches nach einer Gabe von insgesamt 350 000 i.E. innerhalb der biologischen Streuung der Kontrolltiere.

In Abb. 4 wurde die Kathepsin-Aktivität der Versuchsserie I und II auf das Frischgewicht der Leber in Gramm bezogen.

Dieses zweite Bezugssystem wurde gewählt, um mögliche Fehler, die bei der BIURET-Methode infolge einer Leberverfettung nach Gaben von hohen Dosen Vitamin A auftreten, auszuschließen. Aus dem Diagramm geht hervor, daß die Kathepsin-Aktivität auch bei diesem Bezugssystem grundsätzlich das gleiche Verhalten zeigt. Am 12. Tag, nach Gaben von insgesamt 120 000 i.E. Vitamin A, kommt es zu einem geringen Abfall der Enzymaktivität. Im weiteren Verlauf des Versuches steigt die Kathepsin-Aktivität geringfügig an. Nach 20 Versuchstagen (200 000 i.E. Vitamin A) war die Enzymmenge geringgradig über den Wert der biologischen Streuung angestiegen ($27,7\%$). Aus dem Diagramm geht weiter hervor, daß der Lösungsvermittler des Vitamin A-Präparates nicht ohne Einfluß auf die spezifische Aktivität von Kathepsin in der Leber ist. Insbesondere kommt es bei längerer Behandlungsdauer mit Placebo zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität von Kathepsin um $60,4\%$, wenn man den Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppen gleich 100% setzt. Die mittlere Streuung des Mittelwertes beträgt in diesem Falle $\pm 13,5\%$.

In das Diagramm wurde gleichzeitig das Frischgewicht der Lebern in Gramm eingetragen. Das Verhalten des Lebergewichtes

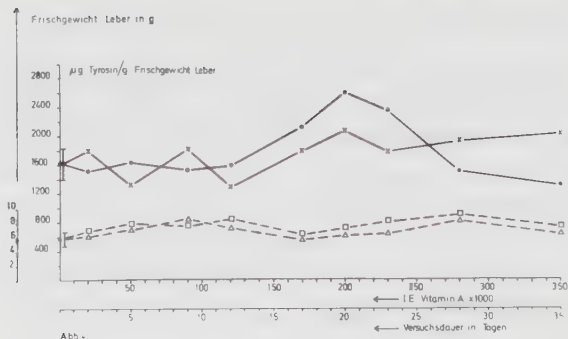


Abb. 4: Spezifische Aktivität von Kathepsin bezogen auf Gramm Frischgewicht der Leber nach intraperitonealer Gabe von Vitamin A

Ordinate: a) μg Tyrosin freigesetzt pro g Frischgewicht der Leber,

b) Frischgewicht der Lebern in g, $\square$ ----- $\square$ Placebogruppe, Δ ----- Δ Vitamin A-behandelte Tiere

Abszisse: a) i.E. Vitamin A x 1000 pro Tier,

b) Versuchsdauer in Tagen. Die biologische Streuung wurde zu Beginn des Versuches von 5 Kontrolltieren ermittelt. —•—•— Placebo-behandelte Tiere, x—x—x Vitamin A-behandelte Tiere.

über die Versuchsdauer von 35 Tagen zeigt, daß bis zu 10 Tagen nach Gaben von insgesamt 100 000 i.E. Vitamin A Placebo- und Vitamin A-Tiere gleiche Lebergewichte aufweisen. Im weiteren Verlauf des Versuches waren die Lebern der Placebogruppe stets geringgradig schwerer als die der mit Vitamin A behandelten Gruppe. Die Gewichts Differenz betrug 0,4 bis 1,6 g. Zu Beginn des Versuches ist die biologische Streuung von 5 unbehandelten Tieren gleichen Körpergewichtes eingetragen.

In der Abb. 5 wurde das Verhalten des Körpergewichtes der Tiere für die Dauer des Versuches dargestellt.

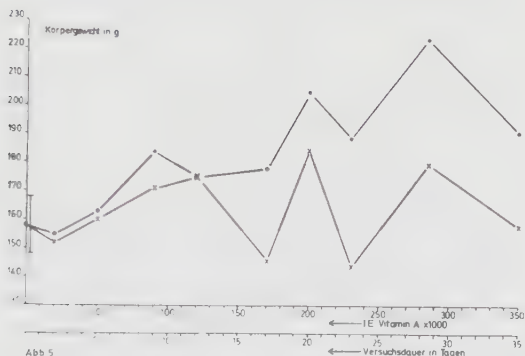


Abb. 5: Körpergewicht der Tiere in g nach intraperitonealer Behandlung mit Vitamin A

Ordinate: Körpergewicht der Tiere in g.

Abszisse: a) Vitamin A in i.E. x 1000 pro Tier,

b) Versuchsdauer in Tagen. Die biologische Streuung des Körpergewichtes der Tiere zu Beginn des Versuches ist in das Diagramm eingezeichnet. Insgesamt wurden 28 Tiere dafür eingesetzt.

•—• Placebo-behandelte Tiere,

x—x Vitamin A-behandelte Tiere.

Nach i.p.-Gabe kommt es dabei sowohl bei Placebo- als auch bei Vitamin A-behandelten Tieren zu Beginn des Versuches nach einer Gabe von ca. 90 000 i.E. Vitamin A zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme der Tiere. Im weiteren Verlauf des Versuches nehmen die mit Placebo behandelten Tiere kontinuierlich an Gewicht zu, während die Vitamin A-hypervitaminotischen Tiere das Ausgangsgewicht des Versuches nicht wesentlich überschreiten.

Die Ergebnisse der Versuchsgruppe III (Seite 14) sind in der Abb. 6 zusammengefaßt. Untersucht wurde das Verhalten der spezifischen Aktivität von Kathepsin in Leberhomogenaten nach einer peroralen einmaligen hohen Dosis von Vitamin A.

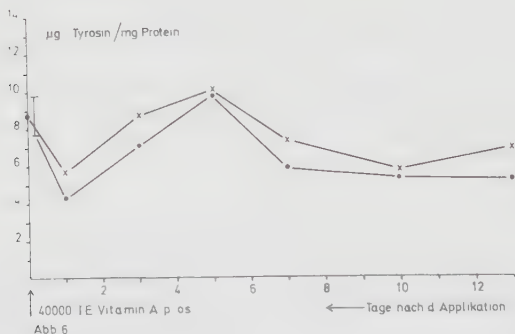


Abb. 6: Spezifische Aktivität von Kathepsin bezogen auf mg Protein in Leberhomogenat nach einmaliger hoher peroraler Gabe von Vitamin A

Ordinate: μg Tyrosin freigesetzt pro mg Protein pro 10 Min., 37°C = spezifische Aktivität.

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen; senkrechter Pfeil: Zeitpunkt der Applikation von Vitamin A (40 000 i.E. per os pro Tier).

—•— Placebo-behandelte Tiere,

x—x Vitamin A-behandelte Tiere.

Die Kathepsin-Aktivität wurde jeweils am 1., 3., 5., 7., 10. und 13. Tag nach der Applikation von Vitamin A bzw. Placebo im Leberhomogenat untersucht.

Alle Tiere erhielten zu Beginn des Versuches 40 000 i.E. Vitamin A per os, die Kontrollgruppe entsprechend das Lösungsmittel bzw. Placebo. Die biologische Streuung von

fünf Kontrolltieren ist in das Diagramm zu Beginn des Versuches eingetragen.

Aus dem Verhalten der Kathepsin-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit nach peroraler Vitamin A-Gabe geht hervor, daß sowohl bei Placebo als auch bei Verabreichung von Vitamin A 24 Stunden nach der Behandlung ein initialer Abfall der spezifischen Kathepsin-Aktivität nachweisbar ist. Bis zum 5. Tag kommt es dann zu einem kontinuierlichen Anstieg, es werden dabei die Werte der Streuung zu Beginn des Versuches erreicht. Das Diagramm zeigt, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen nach einmaliger Applikation einer hohen Dosis Vitamin A kein wesentlicher Unterschied gegenüber der Placebogruppe nachweisbar ist. Eine Vermehrung bzw. Erhöhung der Kathepsin-Aktivität ist unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachweisbar.

In den Abbildungen 7, 8, 9 und 10 sind Versuche zusammengefaßt, in denen die Kathepsin-Aktivität im Leberhomogenat nach chronischer Behandlung von hohen Dosen Vitamin A p e r o s bestimmt wurde (Versuchsgruppe IV, S. 14 + 15).

In der Abb. 7 wurde die Kathepsin-Aktivität auf mg Leberprotein bezogen. Zu Beginn der Behandlung kommt es sowohl nach Gabe von Placebo als auch von Vitamin A (2. Behandlungstag) zu einem initialen Anstieg der Kathepsin-Aktivität um 41,0% bzw. 58,0%, wenn der Mittelwert der biologischen Streuung gleich 100% gesetzt wird. Die Streuung des Mittelwertes beträgt $\pm 12,0\%$.

Im weiteren Verlaufe nach Gabe von insgesamt 100 000 i.E. Vitamin A kommt es zu einem Abfall der Kathepsin-Aktivität bei Vitamin A-behandelten Tieren um 51,8%, bei Placebo-Tieren um 19,6%. Über die weitere Versuchsdauer ist bei Placebo-Tieren keine wesentliche Änderung der Kathepsinaktivität nachweisbar. Es kommt aber nach chronischer peroraler hoher Vitamin A-Gabe (280 000 i.E.) zu einem geringen Anstieg der Kathepsin-Aktivität, die bis gegen Ende des Versuches nach einer Gabe

von insgesamt 520 000 i.E. Vitamin A bis zu 56,3% über den Mittelwert der Kontrolltiere ansteigt.

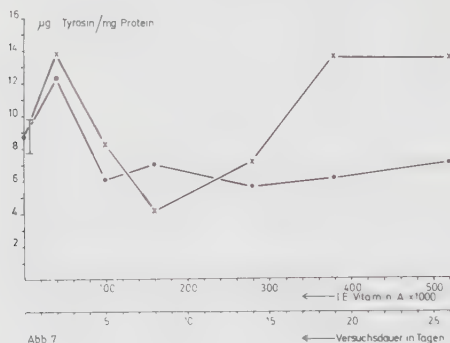


Abb. 7: Spezifische Aktivität von Kathepsin im Leberhomogenat nach chronischer Behandlung mit Vitamin A per os

Ordinate: μg Tyrosin freigesetzt pro mg Protein pro 10 Min.,
37° C

Abszisse: a) Vitamin A i.E. x 1000 pro Tier,
b) Versuchsdauer in Tagen

Die biologische Streuung zu Beginn des Versuches wurde von 5 Kontrolltieren errechnet. •—• Placebogruppe, x—x Vitamin A-behandelte Tiere.

In Abb. 8 wurde als Bezugswert für die Aktivität Gramm Frischgewicht der Leber gewählt. Die spezifische Aktivität pro Gramm Leber nach peroralen Gaben von Vitamin A zeigt gegenüber der Abb. 7 (Bezugssystem mg Protein) keinen wesentlichen Unterschied.

In die Abb. 8 wurde auch das Frischgewicht der Lebern in Gramm eingetragen. Zu Beginn des Versuches wurde von 5 Lebern

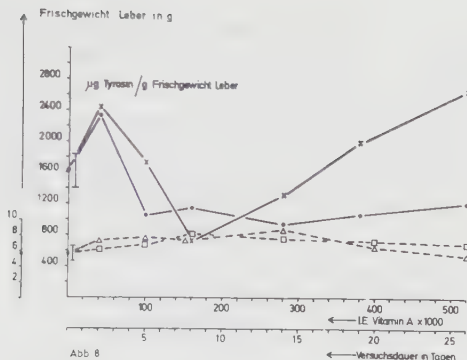


Abb. 8: Kathepsin-Aktivität in Leberhomogenaten nach peroraler Gabe von Vitamin A bezogen auf g Frischgewicht Leber

Ordinate: a) μg Tyrosin freigesetzt pro g Frischgewicht Leber
 Placebogruppe, x..... Vitamin A-behandelte Tiere

b) Frischgewicht der Lebern in g, $\square$ $\square$ Placebogruppe, $\triangle$ $\triangle$ Vitamin A-behandelte Tiere

Abszisse: siehe Abb. 7.

unbehandelter Tiere, die gleiches Körpergewicht hatten, die biologische Streuung errechnet. Aus dem Verhalten des Lebergewichtes über die Versuchsdauer von 25 Tagen geht hervor, daß sowohl bei Placebo- als auch bei Vitamin A-behandelten Tieren das Lebergewicht bis zum 14. Versuchstage kontinuierlich zunimmt. Nach 25 Versuchstagen war das Lebergewicht der Placebogruppe und der mit Vitamin A behandelten Gruppe im Bereich der biologischen Streuung der Kontrolltiere.

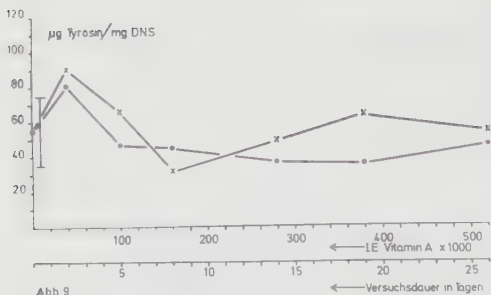


Abb. 9: Kathepsin-Aktivität in Leberhomogenaten nach
per oraler Gabe von Vitamin A bezogen
auf mg DNS

Ordinate: μg Tyrosin freigesetzt pro mg Leber-DNS pro
10 Min. 37°C

Abszisse: a) Vitamin A i.E. x 1000 per os pro Tier,
b) Versuchsdauer in Tagen.

Die biologische Streuung der ermittelten Tyrosin-Aktivitäten bezogen auf mg DNS-Gehalt der Leber wurde zu Beginn des Versuches eingetragen, eingesetzt wurden dafür 5 Kontrolltiere.

Bezieht man jedoch für die gleiche Versuchsanordnung die spezifische Aktivität des Kathepsin auf mg DNS der Leber, so ergeben sich, wie aus Abb. 9 hervorgeht, nach Behandlung mit Vitamin A keine wesentlichen Unterschiede zwischen den mit Placebo- und Vitamin A-behandelten Tieren. Bis auf einen geringgradigen initialen Anstieg sowohl bei Placebo- als auch bei Vitamin A-behandelten Tieren liegen die Meßwerte der spezifischen Aktivitäten im Verlaufe der Behandlung mit steigenden Dosen Vitamin A im Bereich der biologischen Streuung.

Das Verhalten des Körpergewichtes der Tiere aus der Versuchsgruppe IV ist in Abb. 10 dargestellt. Danach kommt es bis zur Gabe von 280 000 i.E. Vitamin A sowohl bei Placebo als auch bei behandelten Tieren zu einem kontinuierlichen Anstieg des Körpergewichtes. Weitere Behandlung sowohl mit Placebo als auch mit Vitamin A führte gegen Ende des Versuches zu einem Abfall des Körpergewichtes.

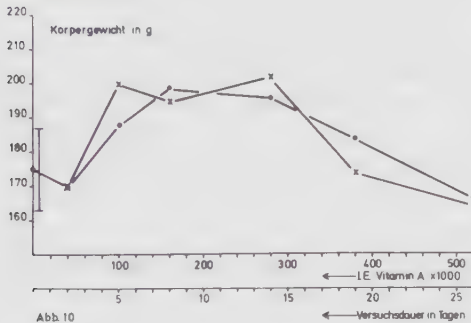


Abb. 10: Körpergewicht der Tiere in g nach p e r o r a -
l e r Gabe von Vitamin A

Ordinate: Körpergewicht der Tiere in g.

Abszisse: a) Vitamin A in i.E. x 1000 pro Tier,
b) Versuchsdauer in Tagen.

6.2 Versuche mit hypovitaminotischen Tieren

6.2.1 Kathepsin-Aktivität der Rattenleber nach verschiedener Dauer von Vitamin A-Mangel

Die Protokolle über den Vitamin A-Mangelzustand der eingesetzten Tiere bzw. Versuchsgruppen sind in den Tabellen 1, 2

und 3 zusammengefaßt. Von Vitamin A-Mangeltieren sowie von den entsprechenden Kontrolltieren wurden die Lebern der Tiere nach dem auf Seite 17 dargestellten Schema zur Bestimmung der Kathepsin-Aktivität im Leberhomogenat aufgearbeitet.

In der Tabelle 4 (S. 35) sind die spezifischen Aktivitäten von Kathepsin im Leberhomogenat der eingesetzten Tiergruppen unter Anwendung verschiedener Bezugssysteme eingetragen. Die Streuung wurde nach der Beziehung $\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$ errechnet. Die Ergebnisse zeigen, daß bei Vitamin A-Mangeltieren die Kathepsin-Aktivität, bezogen auf mg Leberprotein sowie g Frischgewicht, je nach der Dauer der Mangeldiät in geringem Maße zunimmt. Die größte Zunahme wurde bei der Versuchsgruppe C gefunden. Danach kommt es nach einer 29-tägigen Mangelperiode zu einer Steigerung der Kathepsin-Aktivität um 88 bzw. 110% bezogen auf mg Protein bzw. g Frischgewicht Leber. Gleichzeitig nimmt jedoch das Frischgewicht der Leber der Mangeltiere im gleichen Versuchszeitraum gegenüber den Kontrollen um ca. 37% ab.

Wählt man jedoch den DNS-Gehalt der Leber als Bezugssystem der Kathepsin-Aktivität, so ist bei dieser Versuchsgruppe eine Zunahme gegenüber Kontrollen nicht mehr nachweisbar. Es kommt sogar bei Vitamin A-Mangeltieren zu einer meßbaren Abnahme der spezifischen Kathepsin-Aktivität.

TABELLE 1

Protokoll zu den Versuchsgruppen A, B und C*

Zu den Versuchsgruppen A und B sind nur die Körpergewichte der Tiere am Tag der Tötung bekannt.

A. 3 Mangeltiere: Ø 283 g, 3 Kontrolltiere: Ø 318 g

Dauer der Mangeldiät: 105 Tage

B. 2 Mangeltiere: 132 und 180 g, 2 Kontrolltiere: 233 und 243 g

Dauer der Mangeldiät: unbekannt.

C.		Vit.A-Mangeltiere			Kontrolltiere**		
Tier Nr.		1	2	3	4	5	6
Alter bei Beginn d. Mangelperiode		22	21	22	22	22	22
Gewicht bei Beginn d. Mangelperiode in Gramm		55	51	56	51	51	51
Geschlecht		♂	♂	♂	♂	♂	♂
Dauer der Mangel-diät in Tagen		29	30	29	29	29	29
Dauer d. Vit.A-Mangels in Tagen		1	2	1	-	-	-
Gewicht bei Vers.-ende in Gramm		186	189	177	218	187	213
Blutbild %	N.	24,5	20,5	15,5	24,0	8,0	13,5
	Stbk.	1,5	0,5	0,0	0,0	0,5	1,5
	Ly.	72,5	68,0	82,0	73,0	90,0	85,0

N. = segmentkernige Neutrophilie (Norm: bis 20%)

Stbk. = stabkernige Neutrophilie (Norm: 0 - 10%)

Ly. = Lymphozyten (Norm: 70%)

* Das Protokoll wurde von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Holtzmann-Ratten aus der Füllingsdorfer Zucht, die uns von der Firma freundlicherweise überlassen wurden.

** Diese erhielten zweimal wöchentlich 50 i.E. Vitamin A in öliger Lösung per os.

TABELLE 2

Protokoll zu Versuchsgruppe D.*

	Vit.A-Mangeltiere			Kontrolltiere**			
Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	
Alter bei Beginn der Mangelperiode in Tagen	21	21	21	21	21	21	
Gewicht bei Beginn der Mangelperiode in Gramm	58	56	60	60	61	47	
Geschlecht	♂	♂	♂	♂	♂	♂	
Dauer der Mangel-diät in Tagen	59	59	59	-	-	-	
Dauer des Vit.A-Mangels in Tagen	12	12	12	12	12	12	
Gewicht bei Vers.-ende in Gramm	250	226	298	322	324	371	
Blutbild %	N.***	27,0	28,5	45,0	21,5	13,0	20,0
	Stbk.	0,5	0,5	3,5	1,5	2,5	0,5
	Ly.	72,0	70,0	49,0	73,5	82,0	78,0

* siehe Anmerkung Tabelle 1

** siehe Anmerkung Tabelle 1

*** Bezeichnungen siehe Tabelle 1

TABELLE 3

Protokoll zu Versuchsgruppe E.*

		Vit.A-Mangeltiere			Kontrolltiere**	
Tier Nr.		1	2	3	4	5
Alter bei Beginn der Mangelperiode in Tagen		21	21	21	21	21
Gewicht bei Beginn der Mangelperiode in g		65	58	63	59	58
Geschlecht		♂	♂	♂	♂	♂
Dauer der Mangel-diät in Tagen		70	70	70	-	-
Dauer des Vit.A-Mangels in Tagen		unbekannt			-	-
Gewicht bei Versuchsende in g		298	249	281	404	372
Blutbild %	N.***	24,0	31,5	41,0	21,5	9,5
	Stbk.	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0
	Ly.	75,0	66,0	59,0	76,5	88,5

* siehe Anmerkung Tabelle 1

** siehe Anmerkung Tabelle 1

*** Bezeichnungen siehe Tabelle 1

TABELLE 4

Aktivität von Kathepsin im Leberhomogenat von Vitamin A-hypovitaminotischen Tieren.*

Vers.- gruppe Zeit d. Mangel- diät in Tagen	Anzahl der Tiere	Geschl.	$\mu\text{g Tyro.}/$ $10'/37^\circ\text{C}/$ mg Prot. Mittel- werte	$\mu\text{g Tyro.}/$ $10'/37^\circ\text{C}/$ g Frisch- gewicht d. Leber Mittel- werte	$\mu\text{g Tyro.}/$ $10'/37^\circ\text{C}/$ mg DNS Mittel- werte	Leber- gew. in g Mittel- werte
Vers.- gruppe A 105	3	♀	11,44 $\pm 3,32$	1963 ± 263	**	8,9
Kontroll- tiere zu A	3	♀	9,72 $\pm 0,28$	2257 ± 137	**	10,0
Vers.- gruppe B unbekannt	4	♂	7,14 $\pm 1,66$	1852 ± 317	**	4,8
Kontroll- tiere zu B	3	♂	5,77 $\pm 0,36$	1428 ± 277	**	9,0
Vers.- gruppe C 29	3	♂	8,24 $\pm 0,64$	1704 ± 265	79,48 $\pm 3,73$	4,9
Kontroll- tiere zu C	3	♂	4,37 $\pm 0,89$	809 ± 183	66,94 $\pm 4,77$	7,7
Vers.- gruppe D 59	3	♂	8,74 $\pm 2,24$	1376 ± 347	65,16 $\pm 10,75$	5,4
Kontroll- tiere zu D	3	♂	8,07 $\pm 0,67$	1537 ± 126	100,89 $\pm 19,86$	8,5
Vers.- gruppe E 70	3	♂	6,08 $\pm 1,55$	849 ± 234	62,48 $\pm 5,88$	6,4
Kontroll- tiere zu E	2	♂	5,58 $\pm 0,12$	815 ± 45	86,12 $\pm 1,18$	10,0

* Holtzmann-Ratten aus der Füllingsdorfer Zucht, freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von der Fa. Hoffmann-La Roche, Basel.

** wurde nicht gemessen.

TABELLE 5

Spezifische Aktivität von Kathepsin der untersuchten Vitamin A-hypovitaminotischen Tiere der Versuchsgruppen B, C, D und E der Tabelle 4 (Seite 35)

Zahl der Mangeltiere: 13, Zahl der Kontrolltiere: 11

$\mu\text{g Tyrosin}/$ $10 \text{ Min.}/37^\circ\text{C}/$ mg Protein Mittelwert u. Streuung	$\mu\text{g Tyrosin}/$ $10 \text{ Min.}/37^\circ\text{C}/$ g fr. Leber Mittelwert u. Streuung	$\mu\text{g Tyrosin}/$ $10 \text{ Min.}/37^\circ\text{C}/$ mg DNS Mittelwert u. Streuung	Leber- frisch- gew. in g Mittel- wert	Behandlung der Tiere
$7,51$ $\pm 1,73$ $P < 0,05$ $5,97$ $\pm 1,55$	1475 ± 474 $P > 0,1$ 1177 ± 397	$69,04$ $\pm 8,77$ $P > 0,05$ $84,46$ $\pm 19,15$	$5,3$ $8,8$	Vitamin A- Mangeltiere Gruppe B, C, D, E Kontroll- tiere Gruppe B, C, D, E

Eine Verlängerung der Mangelperiode um 59 (Versuchsgruppe D) bzw. 70 Tage (Versuchsgruppe E) bewirkt sogar eine weitere Abnahme der spezifischen Aktivität bezogen auf mg DNS der Leber.

Wurde dagegen bei den Versuchsgruppen D und E die Proteaseaktivität auf den Proteingehalt der Lebern bezogen, so war eine geringe Steigerung der spezifischen Aktivität gegenüber den Kontrolltieren nachweisbar. Bei der Verlängerung der Mangelperiode um 59 bzw. 70 Tage kommt es jedoch gegenüber der Versuchsgruppe C (29 Tage Mangelperiode) nicht zu einer weiteren Steigerung, sondern zu einer Abnahme der Proteaseaktivität. Das Frischgewicht der Leber in g war bei den Mangeltieren der Versuchsgruppen C, D und E jeweils um 37% gegenüber den Kontrollen vermindert.

TABELLE 6:

Spezifische Aktivität von saurer Phosphatase der Versuchsgruppe E

<u>Vit.A-Mangeltiere</u>			
$\mu\text{g P/h/mg Prot.}/37^{\circ}\text{C}$	$\mu\text{g P/h/g fr. Leber}/37^{\circ}\text{C}$	$\mu\text{g P/h/mg DNS}/37^{\circ}\text{C}$	Leberfr. Gew. in g
Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
144,69 $\pm$ 21,7	22.176,0 $\pm$ 6231,0	736,5 $\pm$ 152,4	6,4 $\pm$ 0,45
<u>Kontrolltiere</u>			
160,14 $\pm$ 17,7	23.415,0 $\pm$ 1413,0	1.140,5 $\pm$ 206,0	10,0 $\pm$ 0,50

TABELLE 7:

Spezifische Aktivität von β -Glucuronidase der Versuchsgruppe E

<u>Vit.A-Mangeltiere</u>			
$\mu\text{g Phe./h/mg Prot.}/37^{\circ}\text{C}$	$\mu\text{g Phe./h/g fr. Leber}/37^{\circ}\text{C}$	$\mu\text{g Phe./h/mg DNS}/37^{\circ}\text{C}$	Leberfr. Gew. in g
Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
116,64 $\pm$ 15,1	17.845,0 $\pm$ 4267,0	611,5 $\pm$ 101,1	6,4 $\pm$ 0,45
<u>Kontrolltiere</u>			
147,78 $\pm$ 7,1	21.741,0 $\pm$ 1274,0	1.049,1 $\pm$ 7,2	10,0 $\pm$ 0,50

In der Tabelle 5 wurden die gemessenen spezifischen Aktivitäten der Versuchsgruppen B, C, D und E unter Anwendung der drei gewählten Bezugssysteme, verglichen mit den Kontrolltieren, zusammengefaßt und "P" nach dem t-Test errechnet.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Kathepsin-Aktivität bezogen auf mg Protein sowie g Frischgewicht der Leber signifikant erhöht ist.

Wurde der DNS-Gehalt als Bezugssystem gewählt, so findet man

bei Mangeltieren keine Erhöhung der spezifischen Aktivität, sondern sogar eine signifikante Abnahme.

Für die Versuchsgruppe E (Mangelperiode = 70 Tage) wurden orientierend die spezifischen Aktivitäten von zwei weiteren lysosomalen Hydrolasen gemessen.

Die gefundenen Werte für saure Phosphatase und β -Glucuronidase sind in Tabelle 6 und 7 eingetragen. Die Ergebnisse zeigen, daß bei Vitamin A-Mangeltieren das Lebergewicht gegenüber den Kontrolltieren um ca. 36% abgenommen hat. Beide Enzyme waren bei den hypovitaminotischen Tieren, bezogen auf mg Protein (10%) und auch auf Frischgewicht Leber (6 - 18%), um einen kleinen Betrag vermindert. Relativiert man die spezifische Aktivität der beiden Enzyme auf den DNS-Gehalt, so kommt es bei den Mangeltieren gegenüber den Kontrolltieren sogar zu einer Abnahme um 36 - 42%.

6.2.2 Verteilung der Kathepsin-Aktivität auf subzelluläre Partikel der Leber von Vitamin A-Mangel- und Kontrolltieren

In den Abbildungen 11 und 12 ist die relative spezifische Aktivität von Kathepsin in verschiedenen subzellulären Fraktionen gegen den Proteingehalt aufgetragen.

Für die Diagramme der Abb. 11 wurden die Tiere der Versuchsgruppe C (Seite 32) verwendet. Jede der drei Lebern von Vitamin A-Mangeltieren sowie Kontrolltieren wurde dabei getrennt fraktioniert. In das Diagramm sind Mittelwerte aus je drei Lebern eingetragen.

Aus der Abb. 11 geht hervor, daß bei Vitamin A-Mangeltieren während der Fraktionierung des Leberhomogenates im Überstand ($20\ 000 \times g$) gegenüber Kontrollen vermehrt freie Aktivität gefunden wird. Die partikelgebundene Aktivität von Kathepsin ist vorwiegend in der sog. leichten sowie der schweren Mitochondrienfraktion (R_2 und R_3) lokalisiert. Bei Vitamin A-

Zellkernen besteht, ist bei Vitamin A-Mangeltieren die Kathepsin-Aktivität gegenüber Kontrolltieren erhöht. Dagegen ist die Kathepsin-Aktivität in der R_2 - sowie R_3 -Fraktion gegenüber Kontrollen vermindert.

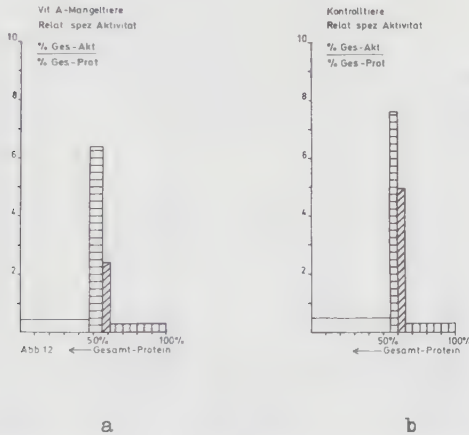


Abb. 12: Relative spezifische Aktivität von Kathepsin in der Leber von Vitamin A-Mangeltieren (59 Tage Mangel-diät, Versuchsgruppe D).

Bezeichnungen und Text wie Abb. 11.

In der Abb. 12 wurden die Tiere der Versuchsgruppe D für die Verteilungsspektren von Kathepsin in subzellulären Fraktionen eingesetzt. Die Zahl der Tiere betrug ebenfalls je drei. Das Diagramm zeigt, daß insbesondere die R_2 -Fraktion einen höheren Proteingehalt enthält. Er beträgt 9% vom Gesamthomogenat gegenüber Kontrollen mit 5%.

Das Diagramm zeigt außerdem, daß auch hier gegenüber Kontrolltieren vermehrt größere Partikel auftreten, die in der R_2 -Fraktion, d.h. schweren lysosomenreichen Mitochondrienfraktion, auftauchen, während die sog. leichte Mitochondrien-

fraktion (R_3) gegenüber der Kontrollgruppe eine verminderte spezifische Aktivität zeigt.

In der Abb. 13 sind alle Versuche, die mit Lebern von Tieren aus den Versuchsgruppen C und D durchgeführt wurden, zusammengefaßt.

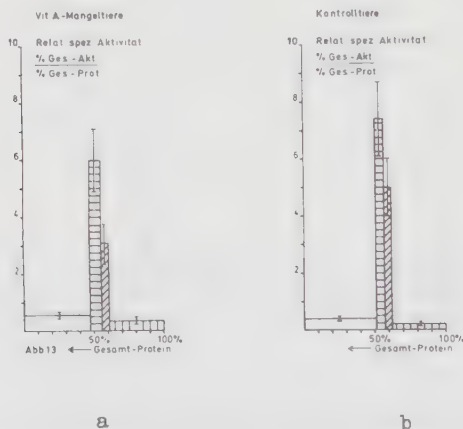


Abb. 13: Relative spezifische Aktivität von Kathepsin in der Leber von Vitamin A-Mangeltieren. Zusammenfassende Darstellung der Enzymverteilung auf subzelluläre Fraktionen von Versuchsgruppe C und D (Abb. 11 u. 12).

Bezeichnungen und Text wie Abb. 11.

Jede Fraktion repräsentiert den Mittelwert von sechs verschiedenen Lebern. Die mittlere Streuung des Mittelwertes ist für jede Fraktion eingetragen. Außerdem wurde "P" für jede Fraktion, verglichen zwischen Vitamin A-Mangeltieren und Kontrolltieren, bestimmt und die Signifikanz mit Hilfe des t-Testes geprüft. Das Ergebnis der Berechnung ist in Tabelle 8 dargestellt.

TABELLE 8:

Signifikanz der relativen spezifischen Aktivität zwischen subzellulären Fraktionen von Vitamin A-Mangeltieren und Kontrolltieren

Versuchsgruppe	Zahl der Tiere	Fraktion	Signifikanz
Mangeltiere Versuchsgruppen C und D der Tabelle 1 und 2 S. 32 und 33	6	R ₁ —————	P < 0,05
		R ₂ —————	P > 0,1
		R ₃ —————	P < 0,01
		Ü —————	P > 0,1
Kontrolltiere C und D S. 32 und 33	6	R ₁ —————	
		R ₂ —————	
		R ₃ —————	
		Ü —————	

R₁ = 10 Min. 1 000 x g-Sediment = Zellkernfraktion

R₂ = 10 Min. 10 000 x g-Sediment = schwere Mitochondrienfraktion

R₃ = 15 Min. 20 000 x g-Sediment = leichte Mitochondrienfraktion

Ü = 15 Min. 20 000 x g-Überstand = freie Aktivität

Die Vitamin A-Mangelgruppen unterscheiden sich von den Kontrollen in folgenden Punkten: die freie, nicht partikelgebundene Aktivität im Überstand ist bei Vitamin A-Mangeltieren erhöht, d.h., daß im Vitamin A-Mangel vermehrt fragile Partikel vorkommen, die entweder während der Präparation zerstört werden, oder daß bereits vermehrt freie Aktivität im Cytosol vorliegt. Die R₃-Fraktion (sog. leichte lysosomenhaltige Mitochondrienfraktion) ist gegenüber Kontrolltieren signifikant vermindert. Das gleiche gilt für die R₂-Fraktion (sog. schwere lysosomenreiche Mitochondrienfraktion), wobei jedoch die R₂-Fraktion bei Vitamin A-Mangeltieren einen höheren Proteingehalt aufweist. Die Zellkernfraktion R₁ enthält

bei Vitamin A-Mangeltieren relativ mehr spezifische Aktivität als bei Kontrolltieren. Zusammenfassend kann man zu dem Verteilungsspektrum sagen, daß im Vitamin A-Mangel vermehrt partikelgebundenes Kathepsin in spezifisch dichteren Partikeln auftritt. Somit verschiebt sich die Verteilung der relativen spezifischen Aktivität in dem Diagramm nach links in Richtung auf schwere Fraktionen. Außerdem ist die Fragilität der Lysosomen bei Mangeltieren erhöht. Dies drückt sich in einer Erhöhung der relativen spezifischen Aktivität im 20 000 x g-Überstand aus.

6.2.3 Resistenz der leichten lysosomenreichen Mitochondrienfraktion (8 000 - 15 000 x g-Sediment)

In der leichten Mitochondrienfraktion wurde die Freisetzung von Kathepsin bei pH 5,0 und 37° C gemessen. Gegenübergestellt wurde die Freisetzung des Enzyms bei Vitamin A-Mangeltieren sowie bei Kontrolltieren. Die für diesen Test verwendeten Versuchstiere sind in der Tabelle 9, Seite 44, zusammengefaßt.

Aus dem Diagramm der Abb. 14 geht hervor, daß Lysosomen, die zwischen 8 000 x g und 15 000 x g sedimentieren, bei Vitamin A-Mangeltieren unter den geprüften Versuchsbedingungen signifikant stabiler sind als bei den entsprechenden Kontrollen. Für die Inkubationszeit von 60 Min. wurde die Signifikanz nach dem t-Test ermittelt. Danach ergibt sich für die Inkubationszeit von 60 Min. bei 37° C und bei acht Freiheitsgraden ein P von < 0,01.

TABELLE 9:

Protokoll der Versuchstiere, die für den Resistenztest der leichten Lysosomenfraktion eingesetzt wurden *

Vitamin A-Mangeltiere						Kontrolltiere **				
Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Alter bei Beginn der Mangelperiode in Tagen	21	23	24	24	24	24	25	23	28	37
Gewicht bei Beginn der Mangelperiode in Gramm	49	50	50	52	51	51	55	50	50	50
Geschlecht	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
Dauer der Mangel-diät in Tagen	38	36	35	35	35	35	34	36	31	22
Dauer d. Vit.A-Mangels in Tagen	5	2	2	6	6	-	-	-	-	-
Gewicht bei Vers.-ende in Gramm	243	196	179	135	140	216	206	197	252	190
Blutbild %										
N***	24,0	20,0	32,0	18,5	25,0	10,5	9,0	19,5	9,5	13,5
Stbk.	2,0	1,0	0,5	0,0	1,0	1,5	1,5	0,0	0,5	0,0
Ly.	72,0	77,5	66,5	81,5	63,0	85,5	89,0	75,0	87,5	83,5

*/** siehe Anmerkung Tabelle 1, *** Bez. siehe Tabelle 1

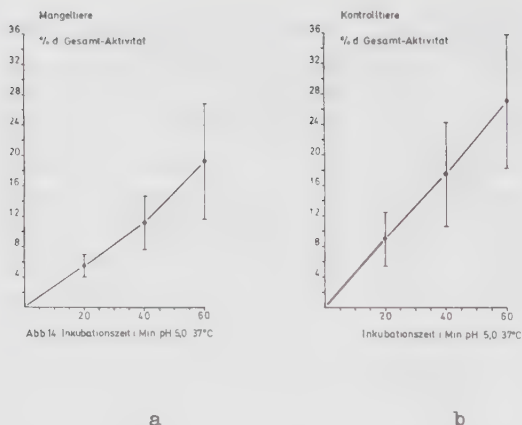


Abb. 14: Freisetzung von Kathepsin aus der leichten Mitochondrienfraktion aus Rattenlebern von Vitamin A-Mangeltieren sowie Kontrolltieren

a) Vitamin A-Mangeltiere b) Kontrolltiere

Abszisse: Inkubationszeit bei 37° C in Min.

Ordinate: % der freien Aktivität bezogen auf die Gesamtaktivität (= 100%).

Die Partikel waren in 0,25m Saccharose, die 0,1m Acetatpuffer pH 5,0 enthielt, suspendiert. Die mittlere Streuung des Mittelwertes von jeweils fünf Vitamin A-Tieren sowie fünf Kontrolltieren wurde nach der Beziehung $\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$ errechnet und in das Diagramm eingetragen.

7. DISKUSSION

Eine große Zahl von Pharmaka und Fremdstoffen, die meist weder nach ihrer chemischen Struktur noch nach ihrer pharmakologischen Wirkungsweise untereinander in Beziehung stehen, sind in der Lage, bestimmte Leberenzyme zu stimulieren und eine "de novo" Enzymsynthese zu induzieren. Dabei sind Enzyme stimulierbar, die in verschiedenen Organellen der Zelle lokalisiert sind: 1. Mikrosomen (endoplasmatisches Retikulum), 2. Mitochondrien und 3. unter bestimmten Bedingungen auch Lysosomen.

Die Induktion dieser Enzyme ist von großer pharmakologischer Bedeutung, da sie einerseits die Biotransformation von Arzneimitteln in vivo und damit deren Wirkungsdauer und Stärke beeinflusst, andererseits die Reaktionslage des Organismus gegenüber äußeren Einflüssen mitbestimmen kann.

Zu den Pharmaka, die eine Induktion mikrosomaler Enzyme bewirken, gehören z.B. Hypnotika und Sedativa, Anästhetika, Tranquilizer, hypoglykämisch wirksame Sulfonamide und Antiphlogistika, Analgetika, Insektizide, Steroidhormone ebenso wie carcinogene, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (Übersichten: CONNY 1967, REMMER 1962 und 1967, KEWITZ 1966).

Die stimulierbaren mikrosomalen Enzyme sind in erster Linie mischfunktionelle Oxygenasen, aber auch Hydrolasen, Reduktasen sowie Transferasen werden vermehrt synthetisiert. Die Enzyminduktion erfolgt bei diesen Stoffen nach Gabe des induzierten Agens in einem Zeitraum von wenigen Stunden bis zu einigen Tagen und kann ein Vielfaches der Ausgangsaktivität erreichen (maximal acht- bis zehnfach).

In den letzten Jahren wurde unter diesen Pharmaka und körperfremden Stoffen eine Gruppe gefunden, die auch mitochondriale Enzyme wie Malatdehydrogenase und Glycerinphosphatdehydro-

genase induziert (KUNZ 1968). Über den Wirkungsmechanismus dieser unspezifischen Reaktion der Leberzelle gegenüber Fremdstoffen und Arzneimitteln ist wenig bekannt. Es wird vermutet, daß das induzierte Agens als ein Antagonist von Repressorproteinen wirkt (REMMER 1962).

Über eine Stimulierung von lysosomalen Enzymen der Leber sind außer den einleitend erwähnten Befunden bisher nur ganz vereinzelt Untersuchungen durchgeführt worden (DINGLE et al. 1966, ROELS et al. 1965, DETER et al. 1967). Es ist jedoch bekannt, daß lysosomale Hydrolasen von Makrophagen, die zur Phagozytose stimuliert wurden, bis um das Vierfache ihrer Grundaktivität stimulierbar sind (COHN et al. 1967, NACHKOVA 1968).

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß eine intraperitoneale Gabe von Vitamin A bei Ratten über 35 Tage mit einer Gesamtdosis von 350 000 i.E. nach einem initialen Abfall lediglich am 20. Behandlungstag zu einem geringen Anstieg der Kathepsin-Aktivität führt. Bezogen auf das Frischgewicht der Leber betrug dieser Wert gegenüber unbehandelten Kontrollen 27%, bezogen auf den Proteingehalt war kein Anstieg nachweisbar. Gegen Ende des Versuches war die Kathepsin-Aktivität im Bereich der experimentellen Streuung von unbehandelten Tieren. Da der verwendete Lösungsvermittler des Vitamin A-Präparates am 20. Behandlungstag sogar zu einem größeren Anstieg der Kathepsin-Aktivität führte (60% bezogen auf das Frischgewicht der Leber in Gramm und 34% bezogen auf mg Protein) als die mit Vitamin A behandelten Tiere, kann der gefundene Effekt bei dieser Versuchsanordnung nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auf die Wirkung des verwendeten Vitamin A-Präparates zurückgeführt werden. Daß das verwendete Vitamin A-Präparat, intraperitoneal verabreicht, wirksam war, geht aus dem Verhalten des Körpergewichtes der Tiere hervor (Abb. 5). Nach 10 Behandlungstagen (100 000 i.E. Vitamin A) kam es zu einem Wachstumsstillstand. Die mit Placebo behandelten Tiere hingegen nahmen über den ganzen Versuchsverlauf

kontinuierlich an Gewicht zu. Außerdem war das Allgemeinbefinden der Tiere durch die Belastung mit Vitamin A erheblich gestört. Nach dem 10. Behandlungstag kam es zu mangelhafter Futteraufnahme und Haarausfall der Tiere. Die Lebern der mit Vitamin A behandelten Tiere zeigten bereits makroskopisch das bekannte Bild einer Leberverfettung (LANE 1968).

Da der verwendete Lösungsvermittler des injizierbaren Vitamin A-Präparates nicht ohne Einfluß auf den Kathepsingehalt der Leber war, wurde für die weiteren Versuche Vitamin A in einem indifferenten Öl gelöst und p e r o s verabreicht. Eine einmalige hohe Dose von Vitamin A (40 000 i.E.) bewirkt dabei im Verlaufe von 14 Tagen keinen Anstieg von Kathepsin in der Leber.

Eine perorale Dauerbelastung mit Vitamin A führt jedoch unter unseren Versuchsbedingungen im Verlaufe von 25 Behandlungstagen zu einem meßbaren Anstieg der Kathepsin-Aktivität von ca. 50 bis 60% gegenüber Kontrollen, bezogen auf das Frischgewicht der Leber in Gramm und auf den Proteingehalt (Abb. 7 und 8).

Vergleicht man diesen Befund z.B. mit der Wirkung eines typischen induzierenden Pharmakons auf oxydierende mikrosomale Enzyme, so kommt es z.B. nach einer einmaligen Dosis von 80 mg/kg Phenobarbital bei der Ratte bereits nach 48 Stunden zu einer etwa vierfachen Zunahme von Cytochrom P 450 (REMMER 1967). Danach kann Vitamin A für lysosomales Kathepsin zumindest nicht als ein stark wirksames induzierendes Agens bezeichnet werden.

Wählt man jedoch für die oben genannte Versuchsanordnung als Bezugssystem den DNS-Gehalt der Leber, der als ein Maß für die Zahl der Zellen angesehen werden kann, so ist die Enzymvermehrung nicht mehr nachweisbar (Abb. 9). Es wäre denkbar, daß dieses Phänomen mit dem Befund von DINGLE et al. (1961) erklärbar ist. Danach bewirkt Vitamin A in Zellkulturen von

embryonalem Knorpelgewebe außer einer Verminderung der RNS eine erhebliche Änderung des DNS-Gehaltes der Zellen. Außerdem bewirkt Vitamin A in Fibroblasten-Kulturen eine dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums (KOCHHAR et al. 1968). Eine zunehmende Verminderung des nicht-enzymatischen Proteingehaltes der Zelle bei Vitamin A-Belastung könnte demnach eine relative Steigerung von Kathepsin bei den Bezugssystemen Protein und Frischgewicht Leber bewirken.

Danach würde eine Enzyminduktion durch Vitamin A zu verneinen sein. Diese Frage bedarf jedoch noch der weiteren Klärung.

Die gefundenen Werte für eine Steigerung der Kathepsin-Aktivität bezogen auf das Frischgewicht der Leber in Gramm nach peroraler Behandlung mit Vitamin A stehen im Einklang mit den Versuchen von DINGLE et al. (1966). Die Autoren fanden bei wesentlich höheren Dosen von Vitamin A (50 000 i.E./die über 50 Tage) eine Steigerung der Kathepsin-Aktivität um ca. 95%.

In neueren Untersuchungen wurde von GEISON et al. (1968) die Hypothese der Enzyminduktion durch Vitamin A an einem im Zytoplasma der Leberzelle lokalisierten Enzym, der Sulfadenyltransferase, überprüft. Auch hier kommt es nicht wie ursprünglich angenommen (WOLF et al. 1960) zu einer Enzymvermehrung bzw. Induktion durch Vitamin A.

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß auch im Vitamin A-Mangel in Abhängigkeit von der Mangelperiode eine signifikante Zunahme von Kathepsin nachweisbar ist, wenn man das Frischgewicht der Leber oder den Proteingehalt als Bezugswert zugrundelegt. Bezogen auf den DNS-Gehalt der Leber trifft dies jedoch ebenfalls nicht zu. Hier kommt es sogar zu einer Abnahme der Enzymaktivität. Da jedoch auch bei verminderter Nahrungsaufnahme bzw. kurz dauernden Hungerperioden bei Ratten wie sie z.B. auch zu Beginn der Verfütterung von Vitamin A-Mangeldiät vorkommen, ein signifikanter Anstieg von Kathepsin in der Leber nachweisbar ist (BEAUFAY et

al. 1959, BIRD et al. 1968), ist es zweifelhaft, ob die von uns sowie auch von ROELS et al. (1965) gefundene Enzymzunahme als eine Folge des Vitamin A-Mangels angesehen werden darf. Für einen solchen unspezifischen Effekt, der auch auf die verminderte Nahrungsaufnahme insbesondere zu Beginn der Mangelperiode zurückgeführt werden kann, spricht auch der Befund, daß die Steigerung der Kathepsin-Aktivität nach einer Mangelperiode von 29 Tagen wesentlich höher war als nach 59 bzw. 70 Tagen.

Im Vitamin A-Mangel kommt es nach den vorliegenden Befunden der Fraktionierung von Lebern zu einer Vergrößerung der lysosomalen Partikel bzw. einer Zunahme ihrer spezifischen Dichte sowie zu einer Erhöhung der freien, nicht partikelgebundenen Kathepsin-Aktivität. Die Vergrößerung lysosomaler Partikel der Leber muß jedoch ebenfalls nicht zwingend auf Vitamin A-Mangel zurückgeführt werden. Solche Befunde wurden u.a. ebenfalls bei Hunger (SWIFT et al. 1964) sowie z.B. auch nach Gabe von Triton (WATTIAUX et al. 1963) und Glukagon (DETER et al. 1967) in der Rattenleber erhoben. Die gefundene Zunahme der freien, nicht partikelgebundenen Aktivität kann einerseits eine Folge der Vergrößerung von lysosomalen Partikeln sein, die dann bei der Aufarbeitung, d.h. beim Homogenisieren, vermehrt zerstört werden. Andererseits unterstützt dieses Ergebnis Befunde, daß hohe Dosen Vitamin A die Stabilität biologischer Membranen vermindern (LUCY und DINGLE 1962).

Von Interesse erscheint der vorliegende Befund, daß bei Vitamin A-Mangeltieren die sog. leichte lysosomenreiche Mitochondrienfraktion (10 000 bis 20 000 x g) gegenüber Kontrollen resistenter ist (Abb. 14).

Lysosomen sind definitionsgemäß heterogene Partikel von unterschiedlicher Größe, die funktionell in verschiedene Typen klassifiziert werden (DE DUVE 1963). Die leichte Lysosomenfraktion besteht vorwiegend aus Golgivesikeln und sog. Primärlisosomen. Sie unterscheidet sich in ihrem Verhalten ge-

genüber Pharmaka (TANAKA et al. 1968) in vitro erheblich von der schweren lysosomenreichen Mitochondrienfraktion (1 000 bis 10 000 x g), die aus "Phagosomen" bzw. Sekundärlysosomen besteht. Die leichte Lysosomenfraktion ist in vitro z.B. gegen pH-Einflüsse stabiler als die schwere Lysosomenfraktion. ROELS et al. (1965) fanden, daß bei Vitamin A-Mangeltieren aus einer Lysosomenpräparation der Rattenleber, die sowohl "schwere" als auch "leichte" Partikel enthielt (500 bis 40 000 x g), die Freisetzung von lysosomaler saurer Phosphatase gegenüber Kontrollen signifikant erhöht ist. Trennt man die leichte Lysosomenfraktion von der schweren, so ist die erstgenannte nach den vorliegenden Befunden unter vergleichbaren Versuchsbedingungen bei Vitamin A-Mangeltieren stabiler als bei Kontrolltieren. Dieser Befund legt den Schluß nahe, daß im Vitamin A-Mangel kompensatorisch eine Population von Lysosomen, möglicherweise Primärlysosomen, entsteht, deren Membran bei pH 5,0 für die Permeabilität von Kathepsin signifikant stabiler ist als bei den entsprechenden Kontrollen. Wieweit die Membran dieser Partikel auch für andere Hydrolasen stabiler ist, bedarf der weiteren Klärung.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei Vitamin A-Gaben sowie Hypovitaminose A unter bestimmten Bedingungen eine Erhöhung der Enzymaktivität von Kathepsin nachweisbar ist. Es ist jedoch zweifelhaft, daß Vitamin A eine Induktion von lysosomalem Kathepsin in der Rattenleber bewirken kann.

8. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Tägliche Behandlung von weiblichen Wistar-Ratten mit 10 000 i.E. Vitamin A intraperitoneal über eine Versuchsdauer von mindestens 35 Tagen (Gesamtdosis 350 000 i.E. Vitamin A) bewirkt keinen Anstieg der Kathepsin-Aktivität im Leberhomogenat.

Die gewählten Bezugssysteme sind dabei: μg Tyrosin freigesetzt pro mg Protein und μg Tyrosin freigesetzt pro g Frischgewicht Leber.

2. Einmalige Applikation einer hohen Dosis Vitamin A per os (40 000 i.E. Vitamin A) bewirkt im Verlaufe von insgesamt 13 Tagen ebenfalls keine Erhöhung der Kathepsin-Aktivität im Leberhomogenat.

3. Weibliche Wistar-Ratten, die 26 Tage lang 20 000 i.E. Vitamin A pro die per os erhalten, zeigen im Verlauf des Versuches über 20 Tage einen maximalen Anstieg der Kathepsin-Aktivität um 56%, wenn als Bezugssystem μg Tyrosin/mg Protein bzw. μg Tyrosin/g Frischgewicht Leber gewählt wird.

Wird bei dieser Versuchsanordnung μg Tyrosin freigesetzt pro mg DNS gewählt, so ist dieser Anstieg der Kathepsin-Aktivität gegenüber Kontrollen nicht mehr nachweisbar.

4. Bei Vitamin A-Mangeltieren nimmt die spezifische Aktivität von Kathepsin im Leberhomogenat zu, wenn als Bezugssystem μg Tyrosin/mg Protein bzw. μg Tyrosin/g Frischgewicht der Leber eingesetzt wird. Die Zunahme der Kathepsin-Aktivität ist abhängig von der Dauer der Vitamin A-Mangelperiode. Wird die Kathepsin-Aktivität auf mg DNS der Leber bezogen, ist eine Zunahme von Kathepsin gegenüber Kontrolltieren nicht mehr nachweisbar.

5. Die Verteilung der Kathepsin-Aktivität auf subzelluläre Partikel der Leber von Vitamin A-Mangeltieren ergibt, daß die freie, nicht partikelgebundene Kathepsin-Aktivität (20 000 x g Überstand) bei Vitamin A-Mangeltieren erhöht ist. Die Partikel, in denen bei Vitamin A-Mangeltieren Kathepsin lokalisiert ist, nehmen an Dichte zu.
6. Die Resistenz der leichten, lysosomenreichen Mitochondrienfraktion unter Einfluß von pH 5,0 bei 37° C wird gemessen. Dabei kommt es bei Vitamin A-Mangeltieren in der leichten, lysosomenreichen Mitochondrienfraktion (8 000 - 15 000 x g Sediment) zu einer erhöhten Resistenz gegenüber entsprechenden Kontrolltieren.
7. Die Frage der Induktion von lysosomalem Kathepsin in der Leber von Tieren, die mit hohen Dosen Vitamin A behandelt werden sowie von Vitamin A-Mangeltieren, wird diskutiert.

9. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ANSON, M.L.: The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. J. Gen. Physiol. 20, 565 (1936)
2. ARONSON, N.N. and DE DUVE, C.: Digestive activity of lysosomes II. J. Biol. Chem. 243, 4564 (1968)
3. BEAUFAY, H., VAN CAMPENHOUT, E. and DE DUVE, C.: Tissue fractionation studies. 11. Influence of various hepatotoxic treatments on the state of some bound enzymes in rat liver. Biochem. J. 73, 617 (1959)
4. BEISENHERZ, G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, R., CZOK, R., GARBADÉ, K.H., MEIER-ARENDT, E. und PFLEIDERER, G.: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase, und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforschg. 8b, 555 - 557 (1953)
5. BENEDETTO, R.J.: Chronic hypervitaminosis A in an adult. J. of Am. Med. Ass. 201, 700 (1967)
6. BIRD, J.W.C., BERG, T. and LEATHEM, J.H.: Cathepsin activity of liver and muscle fractions of adrenalectomized rats. Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 127, 182 - 188 (1968)
7. BODE, C., GOEBBELL, H. und STÄHLER, E.: Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethode. Z. für klin. Chem. u. klin. Biochem. 6. Jhrg., Heft 5, 418 - 422 (1968)

8. BRUCE, N.A. and DUBIN, D.T.: The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. Biol. Chem. 235, 749 (1960)
9. BURTON, K.: The relation between the synthesis of DNA and the synthesis of protein in the multiplication of bacteriophage T₂. Biochem. J. 61, 473 - 483 (1955)
10. BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62, 315 - 323 (1956)
11. COFFEY, J.W. and DE DUVE, C.: Digestive activity of lysosomes. I. J. Biol. Chem. 243, 3255 (1968)
12. COHN, Z.A. and PARKS, E.: The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. IV. The immunological induction of pinocytic vesicles, secondary lysosomes and hydrolytic enzymes. J. of exp. Med. 125, 1091-1104 (1967)
13. CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharm. Rev. 19, 317 (1967)
14. DE DUVE, C.: Lysosomes a new group of cytoplasmatic particles. In: Subcellular particles. Ed. T. Hayashi, New York, Ronald Press, p. 128 (1959)
15. DE DUVE, C., WATTIAUX, R. und WIBO, M.: Effect of fat-soluble compounds on lysosomes in vitro. Biochem. Pharmacol. 9, 97 (1962)

16. DE DUVE, C.: General properties of lysosomes. The lysosome concept. In: Lysosomes. Ciba Found. Symp., J.A. Churchill, Ltd., London, p. 1 (1963)
17. DE DUVE, C. and WATTIAUX, R.: Functions of lysosomes. Ann. Rev. of Physiol. 28, 435.
18. DETER, R.L., BAUDHUIN, P. and DE DUVE, C.: Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. J. of Cell Biol. 35, 11 - 16 (1967)
19. DINGLE, J.T., LUCY, J.A. and FELL, H.B.: Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 1. Effekt of excess of vitamin A on the metabolism and composition of embryonic chicklimb cartilage grown in organ culture. Biochem. J. 79, 497 (1961)
20. DINGLE, J.T. and LUCY, J.A.: Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 5. The effect of vitamin A on the stability of the erythrocyte membrane. Biochem. J. 84, 611 (1962)
21. DINGLE, J.T.: Action of vitamin A on the stability of lysosomes in vivo and in vitro. In: Lysosomes. Ciba Found. Symp., J.A. Churchill, Ltd., London, p. 384 (1963)
22. DINGLE, J.T., SHARMAN, I.M. and MOORE, T.: Nutrition and lysosomal activity. The influence of the vitamin A status on the proteolytic activity of extracts from the livers and kidneys of rats. Biochem. J. 98, 476 (1966)

23. FISHMAN, W.H.,
SPRINGER, B. and
BRUNETTI, R.: Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood β -glucuronidase. *J. biol. Chem.* 173, 449 (1948)
24. FOLLETTE, J.H.,
VALENTINE, W.M. and
LAWRENCE, J.S.: The β -glucuronidase content of human leucocytes in health and disease. *J. Lab. Clin. Med.* 40, 825 (1952)
25. FOLIN, O. and
CIOCALTEU, V.: On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. biol. Chem.* 73, 627 (1927)
26. FRIMMER, M.,
GRIES, J. and
WALDVOGEL, G.: Akute Wirkungen hoher Dosen Vitamin A (Alkohol- Aldehyd und Säure) auf die Stabilität von Lysosomen in der perfundierten Rattenleber. *Intern. Zeitschr. f. Vitaminforschg.* 5, 38 (1968)
27. FRIMMER, M. und
GRIES, J.: In Vitamine A, E und K. Klinische und physiologische Probleme. F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart (im Druck)(1968)
28. GEISON, R.L.,
ROGERS, W.E. and
JOHNSON, B.C.: Comparative effects of vitamin A deficiency and controlled food consumption on adenosine 5'-triphosphate: sulfate adenylyltransferase. *Biochem. Biophys. Acta* 165, 448 - 458 (1968)
29. GIANETTO, R. and
DE DUVE, C.: Tissue fractionation studies.
4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles. *Biochem. J.* 59, 433 (1955)
30. GLAUERT, A.M.,
DANIEL, M.R.,
LUCY, J.A. and
DINGLE, J.T.: Studies on the mode of action of excess of vitamin A. VII. Changes in the fine structure of erythrocytes during haemolysis by vitamin A. *J. of Cell Biol.* 17, 111 (1963)

31. HEIDRICH, H.D.: Die Ödemkrankheit der Schweine. Zentralblatt f. Veterinärmedizin Reihe 3, 13, 142 (1966)
32. HEILMEYER, L.,
KERN, L.,
KASEMIR, H. und
GÜNTHER, E.: Zur Hemmung der Endotoxin-Hautentzündung durch Vorbehandlung mit Vitamin A. Klin. Wschr. 45, 586 (1967)
33. KEWITZ, H.: Variation der Enzyenausstattung der Zelle durch Pharmaka. Der Internist 7. Jhrg., Heft 8, 391 - 400 (1966)
34. KOCHHAR, D.M.,
DINGLE, J.T. and
LUCY, J.A.: The effects of vitamin A (retinol) on cell growth and incorporation of labelled glucosamine and proline by mouse fibroblasts in cultures. Exp. Cell Res. 52, 591 - 601 (1968)
35. KRAUSE, R.F.,
BEAMER, K.C. and
LAWRENCE, C.: Vitamin A deficiency and phospholipid metabolism. Am. J. of Clin. Nutrition 22, 27 (1969)
36. KUNZ, W.,
GEIBEL, U.,
HERBOLD, R. und
SCHNEIDERS, B.: Verlauf der Enzyminduktion in der Leber bei Wachstumsanregung durch Pharmaka. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1252 (1968)
37. LANE, B.P.: Hepatic microanatomy in hypervitaminosis A in man and rat. Am. J. Pathol. 53, 591 (1968)
38. LEVIJ, J.S. and
POLLIACK, A.: Potentiating effect of vitamin A on 9 - 10 dimethyl 1-2 benzanthracene-carcinogenesis in the hamster check pouch. Cancer 22, 300 (1968)
39. LOWRY, O.H.,
ROSENBROUGH, N.J.,
FARR, A.L. and
RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265 (1951)

40. LUCY, J.A.,
DINGLE, J.T. and
FELL, H.B.:
Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 2. A possible role of intracellular proteases in the degradation of cartilage matrix. Biochem. J. 79, 500 (1961)
41. LUCY, J.A. and
DINGLE, J.T.:
The effect of vitamin A on the stability of the erythrocyte membrane. Biochem. J. 82, 31 (1962)
42. LUCY, J.A. and
DINGLE, J.T.:
Vitamin A and membrane systems. 2. Membrane stability and protein-vitamin A-lipid interactions. Biochem. J. 84, 76 (1962)
43. LUCY, J.A.,
LUSCOMBE, M. and
DINGLE, J.T.:
Studies on the mode of action of excess of vitamin A. Biochem. J. 89, 419 (1963)
44. MARCH, B.E. and
BIELY, J.:
Increased incidence of avian leukosis in response to excess vitamin A. Nature 214, 287 (1967)
45. MITCHELL, G.E.:
Vitamin A nutrition of ruminants. J. of Am. Vet. Med. Ass. 151, 430 (1967)
46. NACHKOVA, O.,
BOYADJIEV, G. und
NACHKOV, D.:
Proteolytische Aktivität normaler und antigenstimulierter Makrophagen. Experientia 24, 1056 (1968)
47. REMMER, H.:
Drugs as activators of drug enzymes. First intern. pharmacol. Meeting 6, 234 (1962)
48. REMMER, H.:
Die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle durch Pharmaka. Deutsche Med. Wschr. 44, 2001-2008 (1967)

49. RILEY, P.A. und SPEARMAN, R.J.C.: Vitamin A-induced synthesis of alkaline phosphatase.
Science 160, 1006 (1968)
50. ROELS, O.A., TROUT, M. and GUHA, A.: The effect of vitamin A deficiency and dietary α -tocopherol on the stability of rat-liver lysosomes.
Biochem. J. 97, 353 (1965)
51. ROELS, O.A.: Present knowledge of vitamin A.
Nutrition Reviews 24, 129 (1966)
52. SELKE, M.R., BARNHARD, C.E. und CHANEY, C.H.: Vitamin A requirement of the gestating and lactating sow. J. of An. Sci. 26, No. 4 (1967)
53. SEWARD, C.R., VAUGHAN, G. and HOVE, E.L.: Effect of vitamin A deficiency or excess on oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 214, 1229 (1966)
54. SWIFT, H. and HRUBAN, Z.: Focal degradation as a biological process. Fed. Proc. 23, 1026 (1964)
55. TANAKA, K. and JIZUKA, T.: Suppression of enzyme release from isolated rat liver lysosomes by non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Biochem. Pharmacol. 17, 2023-2032 (1968)
56. TIEWS, J. und ZENTZ, Ch.: Über die Verträglichkeit von Vitamin A und Vitamin A-Säure für das Küken bei starker Überdosierung. Intern. J. for Vitamin Res. 4, 37 (1967)
57. WALD, G.: The visual function of the vitamins A.
Vitamins Hormones 18, 417 (1960)

58. WATTIAUX, R.,
WIBO, M. and
BAUDHUIN, P.:
Influence of the injection of Triton
WR-1339 on the properties of rat-liver
lysosomes. In: Lysosomes. Ciba Found.
Symp., J.A. Churchill, Ltd., London,
p. 176 (1963)
59. WOLF, G. and
VARANDANI, P.T.:
Studies on the function of vitamin A
in mucopolysaccharide biosynthesis.
Biochem. Biophys. Acta 43, 501 (1960)
60. WOLKE, R.E.,
NIELSEN, S.W. and
ROUSSEAU, J.E. jr.:
Bone lesions of hypervitaminosis A in
the pig. Ann. J. of Vet. Res. 29,
1009 (1968)

Herrn Professor Dr. M. Frimmer danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. D. Hegner für seine Beratung und wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Danken möchte ich weiter der Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, für die Überlassung der Vitamin A-Mangelratten und der Vitamin A-Präparate.

LEBENS LAUF

Am 8.3.1937 wurde ich als Sohn des Landwirts Heinrich Leurs und seiner Ehefrau Johanna, geb. van de Sand, in Mörmter bei Xanten (Ndrh.), geboren.

Dort besuchte ich von Herbst 1943 bis Ostern 1948 die Volksschule, anschließend das Collegium Augustianum in Gaesdonck bei Goch, das Progymnasium in Xanten und das altsprachliche Gymnasium in Geldern, wo ich am 4.3.1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1958 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität in Gießen. Dort bestand ich im Herbst 1960 die tierärztliche Vorprüfung. Nach weiteren fünf Semestern legte ich hier am 11.9.1963 die tierärztliche Prüfung ab.

Nach Ableistung meiner Praktikantenzeit bei Herrn Dr. R. Buchen, Wissen/Sieg, erhielt ich am 1.5.1964 meine Approbation als Tierarzt. Danach war ich als Assistent und Vertreter bei mehreren Tierärzten im gesamten Bundesgebiet tätig, vornehmlich aber bei Herrn Dr. J. Beaupoil, Veen über Wesel (Kreis Moers).

Seit Januar 1968 bin ich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt.

